



PCT/FR 99 / 0 3 3 0 4

REC'D 31 JAN 2000

WIPO

PCT

B R E V E T D ' I N V E N T I O N

FR 99 / 3304

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 JAN. 2000

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **30 DEC. 1998**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **98 16676 -**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **30 DEC. 1998**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen



demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

REF 98/0557

53-20-14-20

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Milieu thermosensible pour la séparation électrocinétique d'espèces au sein d'un canal de séparation.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

- 1) INSTITUT CURIE
- 2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)
- 3) UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE-PARIS VI

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

- 1) 26 rue d'Ulm 75248 PARIS CEDEX 05
- 2) 3, rue Michel Ange 75016 PARIS
- 3) Tour Centrale, 4 Place Jussieu 75005 PARIS

Pays

FR
FR
FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

CABINET LAVOIX
M. MONCHENY n° 92.1179

M. Monchény

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9816676

TITRE DE L'INVENTION : Milieu thermosensible pour la séparation électrocinétique d'espèces au sein d'un canal de séparation.

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

- 1) INSTITUT CURIE
- 2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)
- 3) UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE-PARIS VI
- 1) 26 rue d'Ulm 75248 PARIS CEDEX 05 FRANCE
- 2) 3, rue Michel Ange 75016 PARIS FRANCE
- 3) Tour Centrale, 4 Place Jussieu 75005 PARIS FRANCE

Désignent en tant qu'inventeurs :

VIOVY Jean-Louis
26 rue de l'Espérance
75013 PARIS FRANCE

HOURET Dominique
25 rue des Tournanfis
94360 BRY SUR MARNE FRANCE

SUDOR Jan
39 Avenue des Gobelins
75013 PARIS FRANCE

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 30 décembre 1998

CABINET LAVOIX
M. MONCHENY n° 92.1179

A. Monchény

La présente invention concerne le domaine de la séparation électrocinétique de particules, de molécules ou de macromolécules, et plus particulièrement d'acides nucléiques, au sein d'un canal et plus particulièrement dans le cadre de l'électrophorèse capillaire.

5

L'électrophorèse en gel a de très nombreuses applications pour la séparation de particules, de molécules et de macromolécules chargées, et en particulier de macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides. Une application particulièrement importante est le séquençage, c'est à dire la lecture du code génétique de l'ADN. Elle se pratique le plus souvent dans des gels plans et macroscopiques (d'épaisseur de l'ordre de 0,1 à plusieurs mm), composés d'agarose ou de polyacrylamide. Plus récemment, d'autres gels dérivés de l'acrylamide et toute une série de gels d'acrylate ou de méthacrylate ont été proposés à des fins d'améliorations. En particulier, dans le brevet US 5 164 057, il a été proposé l'utilisation de polymères dits "à L.C.S.T." pour contrôler le caractère hydrophile/hydrophobe au sein d'un gel réticulé de façon permanente et irréversible, utilisé en électrophorèse.

20

Malgré ces améliorations, l'électrophorèse planaire en gel présente plusieurs inconvénients.

25

Elle requiert un travail manuel relativement important pour la préparation du gel, qui ne peut être utilisé qu'une fois, et pour la révélation ultérieure des distances de migration. La reproductibilité des expériences d'un gel à l'autre est difficile à obtenir, car les propriétés du gel dépendent des conditions exactes de la préparation. Etant donnée la production de chaleur liée au courant, des tensions assez faibles doivent être employées, conduisant à des temps de séparation longs. Enfin, l'électrophorèse planaire est difficile à automatiser et à quantifier.

30

Pour ces différentes raisons, l'électrophorèse en gel macroscopique tend à être supplantée par des techniques dans lesquelles la séparation s'effectue dans des canaux de grand rapport surface/volume, comme des

capillaires cylindriques (électrophorèse capillaire), ou des canaux de section submillimétrique planaires préparés au sein d'un matériau isolant (électrophorèse sur "puces"). Des exemples de telles séparations sont décrits par exemple dans "Capillary electrophoresis in analytical biotechnology", Righetti ed., CRC press, 5 1996 ou Cheng et coll., Molecular Diagnostics, 1, 183 (1996).

Dans ce qui suit, on désignera l'ensemble de ces méthodes mettant en jeu une séparation électrophorétique dans un canal ou plusieurs canaux dont l'une des dimensions au moins est de dimension submillimétrique, sous le nom "d'électrophorèse capillaire" (EC).

10 L'EC permet des séparations plus rapides et plus résolutive que les gels, ne réclame pas de milieu anticonvectif, et ces propriétés ont été utilisées largement pour effectuer des séparations d'ions en milieu liquide.

Toutefois, une part importante des analytes que l'on souhaite séparer par l'électrophorèse, et notamment ceux rencontrés en biologie, ont en 15 milieux visqueux homogène une mobilité indépendante de leur taille, et ne peuvent être valablement séparés qu'au sein d'un milieu présentant des obstacles. Les gels employés en électrophorèse traditionnelle, notamment, sont formés par des portions de chaînes macromoléculaires ou des fibres connectées entre elles et intraversables par les analytes. Ces derniers doivent se frayer un 20 chemin le long des pores présents entre les blocs macromoléculaires du gel, ce qui donne lieu à la séparation voulue. Dans les premières applications de l'EC à l'ADN et aux protéines, on a souvent eu recours à des gels permanents réticulés à l'intérieur du capillaire. Ceci présente de nombreux inconvénients : la préparation d'un gel bien homogène et sans bulle à l'intérieur d'un capillaire est 25 délicate. Le gel se dégrade relativement vite par hydrolyse, et est contaminé par des impuretés présentes dans les échantillons, qui finissent par dégrader les performances du gel, ou même boucher celui-ci après un nombre limité de séparations. Etant donné le prix de revient et/ou la difficulté de fabrication d'un capillaire rempli de gel, ce défaut rend le coût de cette approche prohibitif.

30 A l'heure actuelle, la grande majorité des séparations de macromolécules biologiques effectuées en EC ont recours à des solutions de polymères hydrosolubles linéaires enchevêtrés présentant l'avantage de pouvoir

être remplacées aussi souvent que nécessaire. A concentration assez élevée, soit significativement au dessus du seuil d'enchevêtrement, les différents polymères de la solution s'enchevêtrent et constituent un réseau transitoire continu d'obstacles topologiques qui ne peuvent être traversés par les analytes, 5 conférant ainsi à la solution des propriétés de séparation électrophorétiques qui peuvent être voisines de celles d'un gel.

Ces solutions de polymères hydrosolubles donnent satisfaction dans certaines applications, mais présentent également de nombreuses limitations.

La première de ces limitations est l'électroosmose, un mouvement 10 d'ensemble du milieu de séparation dû à la présence de charges sur les parois du capillaire ou du canal. Ce mouvement étant souvent variable dans le temps et non-uniforme, il nuit à la reproductibilité des mesures et à la résolution. De nombreuses méthodes ont été proposées pour le combattre, comme le traitement de la surface des capillaires par adsorption d'espèces essentiellement 15 neutres sur les parois du canal de séparation préalablement à la séparation proprement dite (Wiktorowicz et coll., Electrophoresis, 11, 769, 1990, Tsuji et coll., J. Chromatogr. 594, 317 (1992), ou par le traitement du capillaire par une solution acide (Fung et coll., Anal. Chem. 67, 1913, (1995)). Ces méthodes présentent l'avantage d'être peu couteuses et de pouvoir être répétées plusieurs 20 fois pour régénérer un capillaire, mais ne réduisent souvent l'électroosmose que partiellement. Il a été également proposé des méthodes de greffage irréversible d'une couche polymérique essentiellement neutre sur les parois, comme par exemple décrit dans US 4 680 201. Des capillaires traités prêts à l'emploi sont disponibles commercialement (DB/wax, DB17, de J&W scientifique). Ces capillaires 25 traités de façon irréversible conduisent à une bonne réduction de l'électroosmose pour un certain nombre de séparations mais leur durée de vie est limitée et leur coût élevé.

Un autre inconvénient des séparations électrocinétiques en solutions de polymères est que la résolution et la gamme de tailles séparable 30 sont meilleures avec des solutions relativement concentrées et de fortes masses moléculaires (voir par exemple Mitnik et coll., J. Chrom. A, 710, 309 (1995) ou encore Goetzinger et coll., Electrophoresis, 19, 242, 1998)). Ceci est attribué à

des déformations de la matrice de séparation qui limitent la résolution pour les analytes de grande taille et qui sont d'autant plus importantes que la masse moléculaire de la matrice est petite et que sa concentration est faible. Par contre, la viscosité d'une solution de polymères augmente très rapidement
5 quand on augmente la masse moléculaire et la concentration. On est donc limité dans l'application des solutions de polymères hydrosolubles enchevêtrés par la très grande difficulté, et en dernier ressort l'impossibilité, qu'il y a à introduire dans un capillaire de dimensions faibles (typiquement moins de 100 micromètres) une solution de très grande viscosité. Enfin, il faut noter que la
10 gamme de séparation accessible à l'électrophorèse capillaire peut être étendue vers les plus grandes tailles par l'utilisation de champs pulsés. On se heurte alors à des phénomènes d'agrégation de l'ADN qui limitent la portée de l'amélioration, et qui sont eux aussi d'autant plus forts que la viscosité du milieu est faible.

15

Afin de résoudre le dilemme posé par la recherche d'une faible viscosité pour l'injection du milieu de séparation dans le canal, et d'obstacles topologiques résistants pour la séparation, qui conduisent de fait à une forte viscosité, certains auteurs ont proposé d'utiliser un milieu polymère dont la
20 viscosité diminue fortement au cours d'une élévation de température. Ce type de milieu a pour avantage de permettre l'injection dudit milieu dans le capillaire à haute température dans un état de faible viscosité, et la séparation à plus basse température dans un état de plus forte viscosité et présentant de bonnes performances de séparation, comme cela est couramment effectué en
25 électrophorèse en gel, en particulier avec l'agarose.

Dans la demande WO 94/10561 sont notamment proposés des milieux permettant une injection plus facile par élévation des températures. Sont essentiellement décrits dans ce brevet des microgels capables de diminuer de volume à haute température et conduisant ainsi à une solution diluée de
30 particules discontinues de faible viscosité et de se gonfler à basse température jusqu'à occuper entièrement le canal de séparation et à conférer ainsi au milieu un caractère gélifié et de bonnes propriétés de séparation. La demande WO

97/18463 décrit également un milieu de séparation constitué de polymères thermofluidifiants comme la cellulose modifiée présentant donc une transition entre un état de faible viscosité versable et un état de forte viscosité non versable sur une échelle de température de 10°C au plus.

5

En fait, tous ces milieux de séparation présentent une viscosité qui décroît de façon plus ou moins rapide avec la température: il est donc nécessaire de les introduire dans le capillaire à une température supérieure à la température à laquelle s'effectue la séparation, ce qui peut présenter divers inconvénients.

10 Ainsi, dans les appareils d'électrophorèse capillaire, il est très difficile de thermostatier la totalité du capillaire, et il est donc difficile de mettre en œuvre de façon automatique un polymère qui ne serait injectable qu'à une température nettement supérieure à la température ambiante. On pourrait envisager une solution peu visqueuse à la température ambiante, et disposant d'une forte

15 viscosité et de bonnes propriétés de séparation à une température plus basse, mais cela implique d'effectuer les séparations à basses températures, ce qui n'est pas possible pour tous les analytes. En particulier, on sait que pour le séquençage de l'ADN, une résolution optimale des "compressions" est obtenue à relativement haute température (de l'ordre de 50-60°C), ce qui est incompatible

20 avec le principe précédent.

Enfin, des polymères du type thermoépaississant ont été utilisés avec un certain succès en électrophorèse. Plus spécifiquement, ces polymères sont des polymères triblocs de faibles masses moléculaires (typiquement inférieures à 15 000), de la famille polyoxyéthylène-polyoxypropylène-

25 polyoxypropylène (POE-POP-POE) (nom commercial "Pluronic", BASF). A basse température, les blocs POE et POP sont tous les deux hydrosolubles, et étant donnée la faible masse moléculaire du copolymère, les solutions sont relativement peu visqueuses jusqu'à une concentration élevée (de l'ordre de 30 % en masse). En élevant la température, le bloc POP central de chaque polymère devient plus

30 hydrophobe, et ces polymères s'associent pour former des micelles qui confèrent au milieu un caractère organisé (cristal liquide lyotrope). Le mécanisme de thermoépaississement des solutions de tels polymères est lié à la formation

d'agrégats micellaires disjoints, maintenus à une distance relativement constante les uns des autres par les répulsions stériques entre les dits agrégats.

Malheureusement, ce mécanisme présente pour l'électrophorèse plusieurs inconvénients. D'une part, il ne donne lieu à un thermoépaississement qu'à des concentrations en polymère importantes, supérieures à 15 % voire à 20 %, ce qui conduit à une forte friction et à des temps de migration longs. Par ailleurs, les agrégats micellaires n'étant pas connectés entre eux, ils n'opposent pas aux espèces à séparer d'obstacles topologiques continus. En conséquence, ils peuvent donner lieu à de bonnes séparations pour des petits analytes, mais
10 donnent de moins bonnes séparations pour de grandes molécules que les gels traditionnels qui présentent de tels obstacles topologiques continus.

La présente invention a précisément pour objet de proposer un nouveau type de milieux de séparation dont il s'avère possible d'optimiser les
15 propriétés de séparation en fonction de la taille des analytes que l'on cherche à séparer à travers la sélection d'un copolymère spécifique.

L'invention est particulièrement avantageuse dans le cas de séparations électrocinétiques.

20

On entend couvrir sous l'expression séparation électrocinétique, toute méthode visant à séparer l'ensemble ou certaines des espèces contenues dans un mélange, les dites espèces étant communément appelées " analytes ", en les faisant migrer au sein d'un milieu sous l'action d'un champ électrique, que
25 le champ exerce son action motrice sur les analytes de façon directe ou indirecte, par exemple par l'intermédiaire d'un déplacement du milieu lui-même, comme dans l'électrochromatographie, ou d'un déplacement d'espèces annexes telles que des micelles, dans le cas de l'électrochromatographie micellaire, ou par n'importe quelle combinaison d'actions directes et indirectes. Sera
30 également considérée comme une méthode de séparation électrocinétique selon l'invention toute méthode de séparation dans laquelle la dite action du champ électrique est combiné à une autre action motrice d'origine non-électrique.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un milieu thermosensible pour la séparation électrocinétique d'espèces au sein d'un canal de séparation, ledit milieu comprenant un électrolyte dans lequel est dissous au moins un ensemble de copolymères blocs caractérisé en ce que lesdits

5 moins un ensemble de copolymères blocs caractérisé en ce que lesdits copolymères blocs :

- sont présents dans ledit électrolyte à une concentration suffisante pour conférer audit milieu la faculté de transiter réversiblement d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100% à V1, obtenu à une température T2 supérieure d'au

10 moins 20°C à T1 et

- comprennent dans leur structure au moins :

- deux blocs polymériques non-contigus présentant dans ledit électrolyte une LCST et possédant un nombre moyen d'atomes le long de leur

15 squelette supérieur à 50 et

- un bloc polymérique soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.

Le milieu de séparation revendiqué possède donc la capacité de

20 transiter de façon réversible entre un état fluide de viscosité assez basse pour permettre son introduction dans le dit canal, obtenu à une température T1, et un état de viscosité notablement supérieure, et en tout état de cause au moins deux fois supérieure, obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20°C à la température T1. A la température T2, ledit milieu de séparation est

25 avantageusement doté de propriétés de séparation électrophorétique significatives pour des espèces dans une gamme de composition chimique et de taille prédéfinies.

Selon une variante préférée de l'invention, la température T1 est

30 comprise entre 15 et 30°C. Quant à la viscosité V2, elle est préférentiellement supérieure d'au moins un facteur de 5 à la viscosité V1.

Au sens de l'invention, on entend désigner par électrolyte, un milieu condensé capable de conduire les ions. Dans le cas le plus courant, ce milieu est un milieu aqueux tamponné, comme les tampons à base de phosphate, de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), de Borate, de N-
5 tris(hydroxyméthyl)méthyl-3-aminopropane sulfonic acid (TAPS), d'histidine, de lysine, etc..... De nombreux exemples de tampons utilisables en électrophorèse sont connus de l'homme de l'art, et un certain nombre d'entre eux sont décrits par exemple dans " Sambrook et coll., " Molecular Cloning: a laboratory manual ", Cold Spring Harbor Lab, New York, 1989. Cependant, tous types d'électrolyte
10 peuvent être utilisés dans le cadre de l'invention notamment les solvants hydroorganiques comme à titre d'exemple les mélanges eau-acétonitrile, eau-formamide ou eau-urée, les solvants organiques polaires tels que, encore à titre d'exemple, la N-méthylformamide. Particulièrement utiles dans le cadre de l'invention sont les électrolytes dits "tampons de séquençage", constitués par un
15 tampon aqueux à pH alcalin additionné d'une proportion notable d'urée et/ou de formamide.

Au sens de l'invention on entend désigner sous le terme "espèce" de manière générale des analytes. Ces analytes peuvent être des particules, organelles ou cellules, des espèces moléculaires ou macromoléculaires, et en
20 particulier des macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les analogues d'acides nucléiques obtenus par synthèse ou modification chimique, les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides dont on souhaite la séparation totale ou partielle au cours de leur migration électrocinétique au sein dudit milieu de séparation.

25

La faculté de transiter d'un état fluide vers un état visqueux et ce réversiblement, manifestée par le milieu revendiqué, est directement liée à la présence dans ledit milieu d'un ensemble de copolymères thermoréticulables de manière réversible.

30

Ces copolymères sont d'une composition chimique, d'une structure, et employés à une concentration adaptées pour donner lieu au sein de l'électrolyte à une thermoréticulation significative à la température T2.

Au sens de l'invention, on entend désigner par copolymère-bloc, un copolymère constitué de blocs polymériques de compositions significativement différentes, reliés entre eux de façon covalente. Le copolymère-bloc se définit par le fait que chacun des blocs comporte un nombre suffisant de monomères pour présenter au sein de l'électrolyte des propriétés physicochimiques et en particulier de solvation, comparables à celle d'un homopolymère de même composition et de même taille. Il s'oppose au polymère statistique, dans lequel les différents types de monomères se succèdent de façon essentiellement aléatoire, et confèrent à la chaîne, à l'échelle de quelques monomères, des propriétés globales, différentes de celles des homopolymères de chacune des espèces en question. La taille des blocs homopolymères nécessaires pour obtenir ce caractère bloc peut varier en fonction des types de monomères et de l'électrolyte, mais elle est typiquement de quelques dizaines d'atomes le long du squelette. Il est à noter qu'on peut constituer un copolymère bloc dans lequel partie ou totalité des blocs sont eux-mêmes constitués par un copolymère de type statistique. De tels copolymères sont considérés comme des copolymères blocs au titre de l'invention, dans la mesure où on peut distinguer des zones ou blocs de taille et de différence de composition chimique suffisantes pour donner lieu d'un bloc à l'autre à une variation significative des propriétés physicochimiques et en particulier de solvation.

Les copolymères blocs convenant à l'invention possèdent la particularité d'associer dans leurs structures, au moins deux types de blocs.

Le premier type de bloc est soluble dans l'électrolyte utilisé pour la séparation aux deux températures T1 et T2 d'utilisation du milieu revendiqué et préférentiellement ne présente pas dans ledit électrolyte de LCST. Dans le présente texte, on entend par soluble faire référence à une solubilité dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.

En revanche, le second type de blocs est doté d'une LCST dans l'électrolyte utilisé pour la séparation. Plus précisément, ce type de blocs est essentiellement soluble dans ledit électrolyte dans une gamme de températures basses, et essentiellement insoluble dans ledit électrolyte dans une gamme de

températures hautes. La limite entre ces deux gammes de température est appelée "température minimale de démixion" ou plus communément "LCST".

De par la présence de cette multiplicité de blocs à LCST au niveau
5 de leur structure, les copolymères mis en œuvre selon l'invention possèdent la propriété de constituer, à basse température, une solution enchevêtrée macroscopiquement homogène au sein de laquelle les interactions entre différentes molécules de polymères est essentiellement répulsive et de
10 s'associer, suite à une élévation de température, entre eux par interactions attractives entre certaines de leurs parties constituées de polymères à LCST, formant au sein de l'électrolyte où ils sont présents un seul réseau tridimensionnel connecté limité seulement par les parois du contenant.

La LCST moyenne de tout ou partie de ce type de blocs est, selon
15 un mode préféré de l'invention, comprise entre T1 et T2 et plus préférentiellement entre 20 et 60°C.

La longueur et le nombre des blocs à LCST peuvent varier grandement dans le cadre de l'invention, selon l'application désirée, sachant que
20 ces paramètres influent sur la force de la thermoréticulation.

Selon un mode préféré de l'invention, tout ou partie ou une fraction significative des blocs à LCST possèdent le long de leur squelette, un nombre moyen d'atomes supérieur à 250 ou présentent une masse moléculaire supérieure à 2000 et de préférence supérieure à 3500.

25 Au sens de l'invention, on entend par "une fraction significative", ou de façon abrégée par "tout ou partie", une proportion suffisante pour modifier de façon mesurable les propriétés rhéologiques et les propriétés de séparation électrocinétique d'analytes, et en particulier pour donner lieu aux propriétés de thermoréticulation et d'augmentation réversible de viscosité par élévation de
30 température qui caractérisent l'invention.

Des copolymères optimisés pour la mise en œuvre de l'invention sont notamment ceux dans lesquels l'ensemble des blocs à LCST représentent entre 2 et 25 %, de préférence entre 5 et 15 % et de façon encore plus privilégiée entre 8 et 15% de la masse molaire totale moyenne desdits
5 copolymères, ou entre 3 et 20 % et de préférence entre 5 et 10% de la composition totale des copolymères en nombre de moles de monomères.

Le milieu de séparation revendiqué peut avantageusement comprendre un ensemble de copolymères-bloc, comportant un squelette
10 constitué par un bloc ou une multiplicité de blocs, de nature chimique identique ou différente, et présentant le caractère commun d'être essentiellement solubles ou bien solvatés dans l'électrolyte aux températures T1 et T2, auquel sont liés de façon covalente une multiplicité de chaînons latéraux à LCST de nature chimique identique ou différente et présentant le caractère commun d'être
15 essentiellement solubles ou bien solvatés dans l'électrolyte à la température T1, et essentiellement insolubles ou mal solvatés dans l'électrolyte à la température T2.

Toutes sortes de structures de copolymères de ce type peuvent être utilisées pour la mise en œuvre de l'invention, pourvu qu'elles présentent un
20 multiplicité de blocs à LCST non directement connectés, et donnent lieu à une thermoréticulation réversible dans les conditions de séparation.

A titre illustratif des différentes structures susceptibles d'être adoptées par le copolymère selon l'invention, on peut tout particulièrement citer celles où tout ou partie desdits copolymères se présentent :

- 25
- sous la forme d'un polymère à bloc séquencé,
 - sous la forme d'un copolymère en peigne dont le squelette est constitué par un ou plusieurs blocs solubles dans l'électrolyte aux températures T1 et T2 ou encore
 - sous une forme ramifiée.

30 Dans la structure polymère-bloc séquencé, les blocs à LCST et le ou les blocs solubles alternent, de façon régulière ou non, le long d'un squelette essentiellement linéaire.

En fait, il est particulièrement intéressant de choisir des copolymères bloc du type polymère en peigne, présentant donc un squelette essentiellement soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2, porteur d'une multiplicité de chaînons latéraux essentiellement solubles dans l'électrolyte à la température T1 et insolubles dans l'électrolyte à la température T2.

Il est à noter que les caractéristiques bénéfiques des milieux selon l'invention, qui lui sont conférées par la présence de longs polymères hydrophiles porteurs d'une pluralité de greffons plus courts, les dits greffons présentant une LCST, ne pourraient pas être obtenues par exemple avec des polymères constitués d'un chaîne principale à LCST porteuse de greffons hydrophiles, dans la mesure où un polymère de ce deuxième type se contracte au dessus de la LCST et ne peut ainsi donner lieu au réseau continu d'obstacles topologiques nécessaire à la mise en œuvre de l'invention. Les dites caractéristiques ne pourraient pas non plus être obtenues avec un polymère constitué d'une chaîne principale hydrophile porteuse de blocs hydrophobes sans LCST, puisque de tels polymères donnent lieu à une thermofluidification (Annable et coll., Langmuir, 10, 1060, 1994), c'est à dire à un comportement opposé à celui recherché dans l'invention.

20

Sont particulièrement intéressants dans le cadre de la présente invention des milieux de séparation dans lesquels l'une au moins des conditions suivantes est satisfaite:

- tout ou partie des copolymères possèdent un nombre moyen d'atomes, le long d'une section de bloc soluble comprise entre deux points de liaison consécutifs dudit bloc soluble avec des blocs à LCST, supérieur à 200 ;
- tout ou partie des copolymères possèdent une masse moléculaire moyenne supérieure à 30 000 ou un nombre d'atome le long du squelette principal supérieur à 2000 et/ou
- tout ou partie des copolymères possèdent une masse moléculaire moyenne comprise entre 50 000 et 2 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 2 500 et 50 000.

30

Dans la description qui précède et dans toutes celles qui suivent, les masses moléculaires et les nombres d'atomes le long du squelette s'entendent sauf mention explicite du contraire comme des moyennes en masse.

5

Il est particulièrement intéressant pour la mise en œuvre de l'invention d'utiliser des copolymères thermoréticulants dont le ou les blocs solubles aux températures T1 et T2 sont constitués d'au moins un polymère choisi parmi les polyéthers, polyesters comme l'acide polyglycolique, les
10 homopolymères et copolymères statistiques solubles du type polyoxyalkylène comme le polyoxypropylène, polyoxybutylène, polyoxyéthylène, les polysaccharides, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, les polyuréthanes, les polyamides, les polysulfonamides, les polysulfoxydes, le polystyrènesulfonate, les dérivés polyacrylamides et polyméthacrylamides
15 substitués ou non solubles dans ledit électrolyte.

A titre représentatif des polyacrylamides et polyméthacrylamides, on peut tout particulièrement citer le polyacrylamide, l'acide polyacrylique, le poly N,Ndiméthylacrylamide et le polyacryloylaminopropanol.

20

Bien entendu, d'autres polymères solubles dans l'électrolyte peuvent être utilisés selon l'invention en tant que blocs solubles, en fonction de l'application particulière et de la facilité à les introduire au sein d'un polymère bloc de structure souhaitée.

25

Il est plus généralement intéressant que les blocs solubles aient une solvation élevée dans l'électrolyte aux deux températures T1 et T2.

De nombreux types de polymères peuvent être choisis pour constituer les blocs non contigus à LCST au sein d'un copolymère bloc utilisable
30 selon l'invention, en fonction de l'électrolyte envisagé, des températures T1 et T2 préférées pour la mise en œuvre et des analytes à séparer. De nombreux polymères à LCST sont connus de l'homme de l'art, en particulier en milieu

aqueux. Il est ainsi possible de se reporter à l'ouvrage « Polymer Handbook » Brandrup & Immergut, John Wiley, New York.

Selon une variante préférée de l'invention, tout ou partie des blocs polymérique à LCST dérivent d'un ou plusieurs polymères choisis parmi :

- 5 - les polyvinylalkyléther comme le polyvinylméthyléther,
- les hydroxyalkylcelluloses comme l'hydroxyéthylcellulose et la méthylcellulose,
- les homopolymères d'étheroxydes tels les polyoxyalkylènes comme le polyoxypropylène et le polyoxybutylène,
- 10 - les copolymères statistiques et séquencés d'étheroxydes comme les copolymères de type polyoxyalkylène présentant une LCST tels les polyoxyéthylène/polyoxypropylène et polyoxyéthylène/polyoxybutylène,
- les homo- et co-polymères alkylènes tels butylène-propylène, éthylène-propylène et éthylène-butylène et
- 15 - les dérivés polyacryliques dérivant de l'homopolymérisation ou copolymérisation de monomères choisis parmi les acides acrylique et méthacrylique, les acrylates et méthacrylates d'alkyle comme les acrylates d'hydroxypropyle et d'hydroxyéthyle, les N-alkyl-acrylamides ou -méthacrylamides comme les N-éthylacrylamide, N-isopropylacrylamide, les
- 20 N'N'- dialkyl -acrylamides ou -méthacrylamides, les aryl-acrylamides ou -méthacrylamides et les alkylaryl-acrylamides ou -méthacrylamides.

Plus préférentiellement, le copolymère mis en œuvre selon l'invention comprend au moins deux blocs non contigus à propriété LCST dérivant de l'homo- ou co- polymérisation de monomères choisis parmi les acides

25 acrylique et méthacrylique, les N-alkyl-acrylamides ou -méthacrylamides comme les N-éthylacrylamide, N-isopropylacrylamide, les aryl-acrylamides ou -méthacrylamides et les alkylaryl-acrylamides ou -méthacrylamides.

Ainsi, on pourra utiliser à titre d'exemple et de façon non exhaustive

30 en tant que blocs à LCST du N-isopropylacrylamide (NIPAM), du N-

isopropylmethacrylamide, du N,N'-diethylacrylamide, ou des copolymères statistiques de ces monomères entre eux ou avec d'autres.

Conviennent tout particulièrement à l'invention les copolymères
5 suivants :

- les copolymères du type copolymère en peigne dont le squelette est de type acrylamide, acide acrylique, acryloylaminoéthanol ou diméthylacrylamide et au niveau duquel sont greffées des chaînes latérales de type poly(N-alkyl ou N,N dialkyl)acrylamide de préférence de type poly(N
10 isopropylacrylamide), ou des chaînes latérales du type polyoxypropylène ou copolymère polyoxyéthylène/oxypropylène, statistique ou séquencé, ou plus généralement des chaînes latérales de type polyéther notablement plus hydrophobes que le polyoxyéthylène

- les copolymères du type copolymère séquencé et présentant le
15 long de leur squelette une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxypropylène, ou une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxybutylène ou plus généralement une alternance de blocs de polyéthylène et de blocs de type polyéther notablement plus hydrophobes que le polyoxyéthylène.

20

A titre d'exemples, on peut utiliser comme copolymères dans le milieu de séparation revendiqué les copolymères choisis parmi les polyacrylamide/poly(N-isopropylacrylamide) (PAM-NIPAM) ; polyvinylalcool/poly(N-isopropyl- acrylamide) (PVA-NIPAM) ,
25 polyoxyéthylène/polyoxypropylène, polyacrylamide/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, polyacrylamide/polyoxypropylène, acide polyacrylique/polyoxypropylène, acide polyacrylique/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, acide polyacrylique/poly(N-isopropylacrylamide) et polydiméthylacrylamide/ poly(N-isopropyl- acrylamide) (PDMAM-NIPAM).

30

On peut avantageusement utiliser pour la séparation des acides nucléiques un milieu comprenant un copolymère peigne portant le long d'un

squelette de polyacrylamide des blocs à LCST essentiellement constitués de poly-NIPAM, et comportant le long de leur squelette un nombre d'atomes de carbone compris entre 50 et 800, et dont la fraction en masse totale n'excède pas 25 %.

5

Il est également à noter que dans la majorité des applications, et notamment pour séparer des analytes chargés, il est préférable d'utiliser un polymère thermoréticulant essentiellement neutre. Il peut cependant être utile pour certaines applications, et notamment pour séparer des analytes faiblement
10 ou pas chargés, ou tendant à s'associer au polymère thermoréticulant, à choisir un polymère thermoréticulant délibérément chargé. Des polymères de ce type pourront être commodément être préparés par exemple en faisant figurer dans les blocs de type soluble une portion notable d'acide acrylique polymérisé. Un copolymère de ce type est plus particulièrement décrit en exemple 10 ci-après.

15

En ce qui concerne plus particulièrement la concentration en copolymères dans le milieu, elle est généralement inférieure à 20% préférentiellement à 15 % en poids et de préférence comprise entre environ 1 et 8 % en poids.

20

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les copolymères utilisés dans ledit milieu sont avantageusement capables, dès une concentration de l'ordre de 5 % et de préférence de l'ordre de 2 %, en poids de faire transiter réversiblement ledit milieu d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100 % à V1,
25 obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20°C à T 1.

En ce qui concerne la préparation des copolymères mis en œuvre selon l'invention, elle peut être effectuée par toute technique conventionnelle de polymérisation ou polycondensation. Le choix de la méthode de préparation est
30 généralement effectué en prenant en compte la structure désirée pour le copolymère à savoir peigne, linéaire ou ramifié et la nature chimique des différents blocs le constituant.

A titre représentatif de ces variantes de préparation, on peut tout particulièrement citer les procédés selon lesquels lesdit copolymères sont obtenus par :

- polycondensation, polymérisation ou copolymérisation, ionique ou radicalaire, de monomères identiques ou différents, de macromonomères identiques ou différents, ou d'un mélange de monomères et de macromonomères identiques ou différents ou
- par greffage de plusieurs blocs polymériques à LCST sur un squelette polymérique linéaire ou ramifié essentiellement du type soluble, ou par polymérisation de bloc latéraux polymériques à LCST à partir d'un squelette polymérique linéaire ou ramifié essentiellement du type soluble.

De manière préférée, tout ou partie des copolymères mis en œuvre selon l'invention sont obtenus par

- copolymérisation de monomères essentiellement du type soluble et de macromonomères essentiellement du type à LCST comportant à l'une au moins de leurs extrémités une fonction réactive, ou
- copolymérisation de macromonomères essentiellement de type à LCST comportant à l'une au moins de leurs extrémités une fonction réactive et de macromonomères essentiellement de type soluble comportant au sein de leur structure au moins deux fonctions réactives.

A l'aide des règles et modes privilégiés énoncés ci-dessus, l'homme de l'art est capable de préparer des copolymères conformes à l'invention, en adaptant la structure, la nature et le mode de préparation des dits polymères en fonction des propriétés de séparation électrocinétiques recherchées pour une application ou une autre.

A titre représentatif mais non limitatif des milieux de séparation revendiqués, on peut tout particulièrement citer les milieux suivants :

- les milieux transitant d'une viscosité V_1 comprise entre 50 et 1000 cp à une température T_1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V_2 supérieure à V_1 d'un facteur compris entre 2 et 50 à une température T_2 supérieure à 40 °C et en ce qu'il comprend entre 5 % et 20 % en masse de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 30 000 et 200 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal est compris entre 2 000 et 15 000,

- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 3 % et 25 %, et

- une masse moléculaire moyenne des blocs à LCST comprise entre 2 000 et 20 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST compris entre 50 et 300,

- les milieux transitant d'une viscosité V_1 comprise entre 100 et 5 000 cp à une température T_1 comprise entre 15 et 30 °C vers une viscosité V_2 supérieure à V_1 d'un facteur compris entre 5 et 100 à une température T_2 supérieure à 40 °C et en ce qu'il comprend entre 1 % et 8 % en masse de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 500 000 et 3 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 7 000 et 40 000,

- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 3 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne de blocs à LCST comprise entre 3 500 et 30 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST compris entre 50 et 600 et

- les milieux transitant d'une viscosité V_1 comprise entre 100 et 5 000 cp à une température T_1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V_2 supérieure à V_1 d'un facteur compris entre 5 et 1000 à une température T_2

supérieure à 40 °C et en ce qu'il comprend entre 0,1 % et 5 % en masse de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne supérieure à 500 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 7 000,
- 5 - une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 2 % et 15 %, et
- une masse moléculaire moyenne des blocs à LCST supérieure à 5 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST supérieur à 150;

10 Dans la description qui précède et celles qui s'ensuivent, la viscosité citée est celle obtenue à un taux de cisaillement de 10 s⁻¹.

On peut également, dans le cadre de l'invention, inclure dans le milieu de séparation, en plus du ou des copolymères à caractère
15 thermoréticulant, d'autres espèces ne présentant pas ces propriétés, telles qu'en particulier des particules, des polymères hydrosolubles, des polymères associatifs non thermoréticulants, ou encore des agents de surface neutres ou ioniques. Bien entendu, ces adjuvants ne doivent pas donner lieu à une
20 démixion au sein du milieu de séparation ou à une perte du caractère réversible de la thermoréticulation. De tels adjuvants peuvent être intéressants pour moduler les propriétés de thermoréticulation, et/ou le pouvoir séparateur dudit milieu. Il est en particulier connu que l'addition de certains surfactants peut dans certain cas renforcer l'association entre polymères, et donc le caractère thermoréticulant. Il peut également être intéressant d'ajouter au milieu des
25 polymères associatifs ou non de faible masse moléculaire, pour améliorer la séparation des plus petits analytes contenus dans un mélange sans affecter gravement la viscosité globale.

Le milieu revendiqué met à profit sa thermoréticulation qui oppose
30 aux analytes des obstacles topologiques connectés, et permet donc la mise en oeuvre de mécanismes de séparation comparable à ceux qui ont prouvé leur efficacité dans l'électrophorèse en gel et en solutions de polymères fortement

enchevêtrés sans présenter les inconvénients de ces derniers en termes de viscosité à l'injection.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un milieu de séparation tel que défini ci-dessus pour la séparation-électrocinétique d'espèces choisies parmi des espèces moléculaires ou macromoléculaires, et en particulier des macromolécules biologiques comme les acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides), les analogues d'acides nucléiques obtenus par synthèse ou modification chimique, les protéines, les polypeptides, les glycopeptides et les polysaccharides, des molécules organiques, des macromolécules synthétiques ou des particules telles que des particules minérales, de latex, des cellules ou des organelles.

Elle est particulièrement utile pour le séquençage de l'ADN, pour lequel elle permet d'obtenir des conditions de séparation optimales liées à une forte viscosité, à une température élevée pour laquelle la résolution des compressions est bonne et la séparation rapide, tout en conservant à la température ambiante une viscosité modérée permettant une injection aisée de l'ADN.

Cependant, la possibilité offerte par l'invention de faire varier grandement la viscosité du milieu en changeant de température est également avantageuse pour d'autres applications. Elle est en particulier avantageuse chaque fois qu'une augmentation de la rigidité ou de la viscosité du milieu de séparation serait souhaitable mais n'est pas possible ou pas aisée à cause de difficultés d'injection dans le capillaire. Par exemple, une viscosité élevée permet de réduire les effets électrohydrodynamiques responsables d'une mauvaise séparation des grands ADN en champ pulsé (voir par exemple Heller et coll, Electrophoresis, 16, 1423-1428 (1995), et autorise ainsi l'utilisation de champs électriques plus intenses, ce qui a pour conséquence une réduction du temps de séparation.

Un autre avantage des fortes viscosités autorisées par les milieux selon l'invention pendant la séparation, est que de telles viscosités réduisent

l'électroosmose (voir par exemple Bello et coll., Electrophoresis, 15, 623, 1994), et améliorent donc la séparation. Si la réduction d'électroosmose n'est pas suffisante, on peut associer l'invention avec des modes de réduction de l'électroosmose peu coûteux bien connus de l'homme de l'art tels que
5 l'adsorption d'espèces neutres ou le traitement préalable du capillaire à l'acide, préalablement à l'introduction du milieu de séparation, et obtenir ainsi une réduction d'électroosmose bien supérieure à celle obtenue avec ces traitements et des milieux de séparation conventionnels.

10 Avantageusement, il est possible de moduler les propriétés séparatrices du milieu revendiqué via la sélection d'un copolymère conforme à l'invention et dont l'effet thermogélifiant est plus particulièrement optimisé pour la séparation d'espèces de tailles définies.

 A titre illustratif de ce type d'adaptation accessible selon l'invention,
15 on peut en particulier :

 - séparer des molécules de masse moléculaire inférieure à 50 000 ou des oligonucléotides comprenant moins de 100 nucléotides, ou encore des protéines natives ou dénaturées avec un milieu transitant d'une viscosité V1 comprise entre 50 et 1000 cp à une température T1 comprise entre 15 et 30°C
20 vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 2 et 50 à une température T2 supérieure à 40 °C et comprenant entre 5 % et 20 % en masse de copolymères possédant

 - une masse moléculaire moyenne comprise entre 30 000 et 200 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal est compris entre
25 2 000 et 15 000,

 - une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 2 % et 20 %, et

 - une masse moléculaire moyenne des blocs à LCST comprise entre 2 000 et 20 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST
30 compris entre 50 et 300.

- séparer des produits de réaction de séquence d'ADN, des ADN duplex de moins de 1000 paires de bases, des protéines dénaturées ou des polymères synthétiques ou naturels de masse moléculaire comprise entre 20 000 et 1 000 000 avec un milieu transitant d'une viscosité V1 comprise entre
 5 100 et 5 000 cp à une température T1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 5 et 100 à une température T2 supérieure à 40° C et comprenant entre 1% et 8% en masse de copolymères possédant :

- une masse moléculaire moyenne comprise entre 500 000 et
 10 3 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 7000 et 40 000,

- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 3 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne de blocs à LCST comprise entre
 15 3 500 et 30 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST compris entre 50 et 600 ou

- séparer des ADN duplex de taille comprise entre 500 bases et plusieurs millions de paires de bases, ou des particules telles que des latex, des
 20 cellules entières, des chromosomes entiers ou des organelles avec un milieu transitant d'une viscosité V1 comprise entre 100 et 5 000 cp à une température T1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 5 et 1000 à une température T2 supérieure à 40 °C et comprenant entre 0,1 % et 5 % en masse de copolymères possédant

25 - une masse moléculaire moyenne supérieure à 500 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 7 000,

- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 2 % et 15 %, et

- une masse moléculaire moyenne des blocs à LCST supérieure à
 30 5 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST supérieur à 150.

Plus préférentiellement, ces milieux comprennent un ensemble de copolymères choisis parmi :

- les copolymères du type copolymère en peigne dont le squelette est de type acrylamide, acide acrylique, acryloylaminoéthanol ou diméthylacrylamide et au niveau duquel sont greffées des chaînes latérales de type poly(N isopropylacrylamide) et
- les copolymères du type copolymère séquencé et présentant le long de leur squelette une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxypropylène, ou une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxybutylène ou plus généralement une alternance de blocs de type polyoxyalkylène solubles et de blocs polyoxyalkylène à LCST.

A titre illustratif de mode d'utilisation du milieu de séparation revendiqué, on peut notamment proposer celui comprenant au moins les étapes suivantes:

- la sélection d'un milieu de séparation selon l'invention, en fonction des caractéristiques des espèces à séparer ;
- la mise en oeuvre de ce milieu dans un canal de séparation d'appareil d'électrophorèse en une quantité suffisante pour en constituer le milieu de séparation, ledit canal étant thermostaté à une température voisine de T_1 ;
- le chauffage de la portion thermostatée du canal de séparation à une température voisine de la température T_2 ;
- l'introduction à l'entrée du canal de séparation d'une quantité d'échantillon
- la réalisation de la séparation à une température voisine de T_2 dans la partie thermostatée du canal; et
- la détection par des moyens appropriés de la migration des analytes.

Il est à noter que l'utilisation du milieu revendiqué, couvre également les variantes dans lesquelles la température est modifiée au cours de

l'étape de séparation, dans la mesure où ladite variation de température comprend une température à laquelle s'effectue la thermoréticulation du milieu telle que définie précédemment, ou dans lesquelles le cycle ci-dessus est répété un nombre quelconque de fois, préférentiellement de façon automatique. Par ailleurs, l'introduction de l'échantillon peut, dans le cadre de l'invention, être effectuée avant ou pendant le chauffage de la portion thermostatée du canal.

La présente invention a également pour objet les dispositifs d'électrophorèse capillaires dont ceux sur puces mettant en oeuvre à titre de milieu de séparation un milieu conforme à l'invention.

Les figures et exemples donnés ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

Figures

15

Figure 1 : Evolution de la viscosité en fonction de la température pour différents copolymères PAM-NIPAM, PDMA-NIPAM et pour un polyacrylamide conventionnel en solution à 5 % dans l'eau

Figures 2 : Evolution de la viscosité en fonction de la température de copolymères selon l'invention

- le copolymère PAM-NIPAM T10, dans l'eau, dans un tampon 0,2M K_2CO_3 et un tampon 50 mM Tris-Taps, 7M urée utilisable pour le séquençage de l'ADN (figure 2a) et

- un copolymère PAM-NIPAM à deux concentrations différentes (2 et 3 %) (figure 2b).

Figures 3 : Exemple de séparation de fragments d'ADN duplex dans la gamme de taille 100-12000 paires de base ("kb ladder", Life Technologies, Paisley, UK) dans un milieu de séparation selon l'invention (polymère PAM-NIPAM (T15) en solution à 2 % dans un tampon TRIS-TAPS à 25° C (figure 3a) et 60°C (figure 3b)

Figures 4 : Electrophorégrammes représentant la séparation de fragments de restriction "PhiX-174-RF DNA Hae III digest" (Pharmacia biotech) dans un milieu selon l'invention obtenu à base de polymère T7, à 20°C (figure 4a) et à 50°C (figure 4b).

Figures 5 : Exemple de séparation de fragments d'ADN duplex " 100 bp fluorescein ruler, Bio-Rad) dans un milieu de séparation selon l'invention à base de T21 à deux températures 20° C (Figure 5a) et 60° C (Figure 5b).

Figures 6 : Portions d'électrophorégrammes représentant la séparation d'un produit de réaction de séquence obtenu avec un milieu selon l'invention à base d'un copolymère PAM-NIPAM (T10) à 5 % en tampon TRIS-TAPS 7M urée à 60° C (figure 6c), PAM-NIPAM (T10) à 3 % (figure 6b) et avec un milieu de séquençage commercial (POP6 Perkin-Elmer) (figure 6a).

Figures 7 : Portions d'électrophorégrammes représentant la séparation d'un produit de réaction de séquence obtenu avec un milieu selon l'invention à base d'un copolymère PAM-NIPAM (T10) à 5 % en tampon TRIS-TAPS 7M urée à 60° C (figure 7c), PAM-NIPAM (T10) à 3 % (figure 7b) et avec un milieu de séquençage commercial (POP6 Perkin-Elmer) (figure 7a).

Figure 8 : Electrophorégrammes représentant la séparation de grand ADN duplex "high Mw markers" (Life Technologies, Paisley, GB), par électrophorèse pulsée dans un milieu selon l'invention obtenu à base de polymère T10 à 60°C.

Figures 9 : Evolution de la viscosité en fonction de la température pour

- un copolymère PVA-NIPAM, comparativement à celle d'un polymère PVA et

- un copolymère POP-POE-POP au regard de celle d'un polymère POE à une concentration de 5 %.

Figures 10 : Exemple de séparation de fragments d'ADN duplex dans la gamme de taille 50-500 paires de base (sizer 50-500 bp, Pharmacia biotech) dans un milieu de séparation selon l'invention à base de PVA-NIPAM à deux températures 20° C (Figure 10a) et 40° C (Figure 10b).

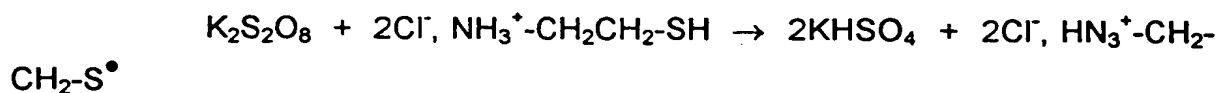
Figures 11 : Electrophorégrammes représentant la séparation du sizer 50-500 bp, Pharmacia biotech, obtenus avec dans un milieu à base de POE (Figure 11a), à base de POP-POE-POP à 25° C (Figure 11b) et à base de POP-POE-POP à 45° C (Figure 11c).

15

EXEMPLE 1 : Préparation de différents macromonomères à LCST de poly(NIPAM) aminé en vue de la préparation de copolymères thermogélifiants conformes à l'invention.

20 1) Polymérisation du NIPAM

La polymérisation radicalaire du NIPAM est réalisée dans l'eau pure, à une température légèrement supérieure à l'ambiante mais inférieure à la L.C.S.T. du polymère. L'amorceur est un couple redox dont l'oxydant est le persulfate de potassium, $K_2S_2O_8$ (KPS) ou le persulfate d'ammonium $(NH_4)_2 S_2O_8$ et le réducteur est l'aminoéthanethiol AET, HCl. La réaction d'amorçage est :



L'AET,HCl joue également le rôle d'agent de transfert, ce qui permet de contrôler la longueur des chaînes en variant sa concentration.

Mode opératoire

Dans un tricol de 500 ml surmonté d'un réfrigérant et équipé d'un dispositif d'arrivée d'azote, on introduit 20 g de NIPAM (0,18 mole) et 200 ml d'eau. le mélange est alors agité et chauffé à 29°C par un bain d'eau. On

démarre le barbotage d'azote. Au bout de 45 minutes, on ajoute 0,42 g d'AET,HCl (0,0037 mole) préalablement dissous dans 20 ml d'eau, puis 0,0018 moles de persulfate d'ammonium (KPS) dissous dans une quantité minimale d'eau. Le mélange est maintenu sous agitation durant 3 heures. La solution est
5 ensuite concentrée puis lyophilisée.

Pour isoler le polymère on réalise une précipitation selon la procédure suivante :

Le solide obtenu est redissous dans 100 ml de méthanol. le chlorhydrate présent est neutralisé par addition de 0,0037 mole de KOH (soit
10 0,208 g dissous dans environ 25 ml de méthanol) incorporés goutte à goutte dans la solution. Le sel formé, KCl, précipite et est extrait par filtration. Le filtrat ainsi récupéré est concentré puis versé goutte à goutte dans 4 litres d'éther. Le polymère précipite et est récupéré par filtration sur fritté n° 4. Le solide est ensuite séché sous vide de pompe à palettes. Le rendement massique est de
15 l'ordre de 50 %.

On obtient ainsi un polymère PNIPAM-A-10. Pour obtenir des chaînes de taille différente, le même protocole est appliqué en modifiant la température de polymérisation ou les rapports amorceur-monomère :

$$R_o = [R-SH] / [NIPAM] \text{ et } A_o = [KPS] / [NIPAM].$$

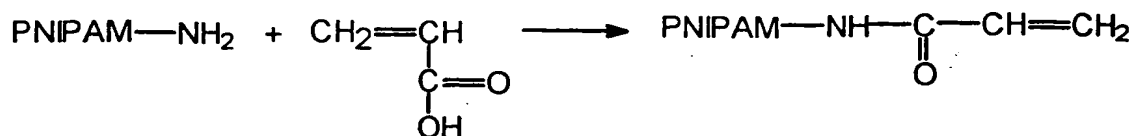
20 Pour le polymère PNIPAM-A-10, on a utilisé respectivement $R_o=0,002$ et $A_o=0,01$. Il a également été synthétisé deux autres polymères, à une température voisine de 23°C, PNIPAM-A-5, correspondant à des rapports $R_o=0,002$ et $A_o=0,01$, et PNIPAM-A-20, correspondant à des rapports $R_o=0,001$ et $A_o=0,01$.

25

2) Modification des PNIPAM aminés en vue de leur copolymérisation avec un ou plusieurs blocs solubles aux températures T1 et T2.

Les macromolécules de PNIPAM-A synthétisées présentent des fonctions amines en bout de chaînes, celles-ci provenant de l'amorceur
30 aminoéthanethiol AET,HCl. Par réaction de la fonction amine sur l'acide

acrylique, on fixe une double liaison vinylique à l'extrémité de la chaîne selon le schéma réactionnel suivant :



Mode opératoire :

5 Dans un bécher de 100 ml, on introduit 50 ml de chlorure de méthylène, 1,5 g d'acide acrylique (0,021 mole), 9 g de PNIPAM aminé et 4,3 g de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) (0,21 mole).

Le milieu réactionnel est agité pendant une heure. L'acide acrylique étant en fort excès par rapport au PNIPAM aminé (la quantité d'acide acrylique est environ vingt fois celle du PNIPAM aminé), on peut supposer que toutes les fonctions amines ont été modifiées, ce qui sera confirmé par les copolymérisations décrites dans l'exemple 2.

15 Le mélange est ensuite filtré sur fritté n° 4 pour éliminer le précipité dicyclohexylurée, sous-produit résultant de la transformation du DCCI, concentré jusqu'à 15 ml puis versé goutte à goutte dans 200 ml d'éther pour précipiter le polymère. On filtre sur fritté n° 4 et on lave le solide avec trois fois 100 ml d'éther puis on le sèche sous vide de la pompe à palettes pendant une nuit.

On obtient ainsi un macromonomère poly(NIPAM) porteur d'une fonction allyl (appelé PNIPAM-5, PNIPAM-10 ou PNIPAM-20, si l'on est parti du PNIPAM-A-10, du PNIPAM-A-5 ou du PNIPAM-A-20, respectivement), avec un rendement massique de l'ordre de 70 %.

25 Les masses molaires des macromonomères préparés ont été mesurées par SEC (chromatographie d'exclusion stérique) dans les conditions suivantes:

PNIPAM 5 et 20: dans une solution aqueuse de LiNO_3 0,5 M à 20°C, en utilisant 4 colonnes Shodex OH Pack B 803 à B806 de 25 cm en série, avec détection réfractométrique, avec un étalonnage de masses moléculaires relatif à un standard POE.

- 5 PNIPAM 10: Dans le THF à 40°C, avec colonne ustrastyrigel (chromatographe Waters 150 CV+), double détection réfractométrique et viscosimétrique et étalonnage universel par rapport à des échantillons de polystyrène. Les résultats sont données dans le tableau 1 ci-dessous :

10

TABLEAU 1

Masse moléculaire	PNIPAM-10 (universel)	PNIPAM-5 (equivalent POE)	PNIPAM-20 (equivalent POE)
Mn (g/mol)	6300	2500	4500
Mw (g/mol)	20400	4500	21000
polymolécularité	3,2	1,8	4,6

- Ces résultats montrent que le PNIPAM-20, obtenu avec une moindre quantité d'amorceur que PNIPAM-5, présente une masse moléculaire plus importante, et qu'il est également possible de jouer sur la température pour faire varier la masse moléculaire. Il s'avère donc possible de préparer des macromonomères de différentes masses moléculaires, pour obtenir différents types de copolymères selon l'invention en fonction des propriétés finales désirées.
- 15

EXEMPLE 2 : Préparation de différents copolymères à structure peigne et comprenant à titre de blocs à LCST les PNIPAM préparés en exemple 1.

- Cet exemple a pour objet la préparation de copolymères selon
- 5 l'invention par copolymérisation de macromonomère(s) PNIPAM obtenu(s) selon l'exemple 1 avec des monomères du type hydrosoluble.

a) Synthèse

- Cette copolymérisation est réalisée dans l'eau à une température voisine de la température ambiante. L'amorceur utilisé est le couple
- 10 redox persulfate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ - métabisulfite de sodium $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5)$. Un certain nombre de polymères synthétisés dans différentes conditions sont répertoriés dans le tableau 2 ci-après, qui rend également compte des quantités de réactif utilisées.

TABLEAU 2

Copolymère	Monomère	Macromonomère	Na ₂ S ₂ O ₅	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Méthode de purification	Température	Viscosité à 25°C*	Viscosité à 60°C *
* T7	DMAM (2,8 g)	PNIPAM-10 (0,7g)	5 g/l (0,311 ml)	20 g/l (0,311 ml)	Ultrafiltration + lyophilisation	29° C	500	8000
* T10	AM (2,8 g)	PNIPAM-10 (0,4g)	5 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	29° C	1000	11000
T10AA	AM (2,8 g)	0	5 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	29° C	800	700
T11	AM (2,8 g)	PNIPAM-10 (0,8 g)	20 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	23° C	100	1000
*T12	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,8 g)	20 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	23° C	30	2000
*T13	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,8 g)	10 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	23° C	100	10000
T15	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,4 g)	5 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	25° C	200	13000
T16	AM (2,8 g)	PNIPAM-5 (0,4g)	5 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	29° C	800	15000
T21	AM (2,8 g)	PNIPAM-20 (0,4 g)	10 g/l (0,451 ml)	20 g/l (0,451 ml)	Précipitation dans l'acétone	23° C	30	1800

*: Les viscosités sont exprimées en centipoises, pour un polymère en solution à 5% dans l'eau et à un taux de cisaillement de 10 s⁻¹.

Le mode opératoire présenté ci-après est donné pour la préparation du copolymère T7. Les modes opératoires pour les autres copolymères peuvent en être déduits en modifiant la nature et la concentration des réactifs et éventuellement la température de réaction conformément au tableau T2.

Dans un ballon de 100 ml sont introduits le PNIPAM-10 et le monomère considéré selon les indications du tableau 2, ainsi que 30 ml d'eau distillée. Ce mélange est agité deux heures à température ambiante sous barbotage d'azote afin d'éliminer le dioxygène dissous.

On porte alors le mélange à la température choisie pour la polymérisation à l'aide d'un bain marie thermostaté, on ajoute les amorceurs sous forme d'une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ à 20 g/l et d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ à 5 g/L, soit respectivement 0,1 % et 0,03 % en mole de la quantité de monomères introduits. Le mélange est maintenu sous agitation et barbotage durant 4 heures.

Avant l'introduction des amorceurs, puis toutes les heures durant la polymérisation, on peut effectuer des prélèvements du milieu réactionnel (0,1 ml dilués dans 5 ml de méthanol) afin de suivre l'évolution de la réaction par chromatographie d'exclusion stérique.

Généralement, les données associées à l'observation visuelle de l'augmentation de la viscosité du milieu réactionnel permettent de conclure au bon déroulement de la réaction, avec un rendement pratiquement total.

b) Purification

La purification des polymères se fait différemment selon la nature du squelette.

Pour les polymères dont le squelette est constitué de DMAM, il a été utilisé l'ultrafiltration selon le mode opératoire suivant :

Le milieu réactionnel est dilué dans un litre d'eau puis ultrafiltré sur une membrane dont le seuil de coupure est 100.000 daltons. La solution de polymère est ensuite concentrée puis lyophilisée.

Le rendement est de l'ordre de 60 %.

Les macromolécules à squelette acrylamide sont précipitées dans l'acétone selon la procédure suivante :

Le milieu réactionnel est précipité lentement dans 1 litre d'acétone puis filtré sur fritté n° 4 et lavé avec trois fois 100 ml d'acétone. Le solide est
5 récupéré puis séché une nuit à la pompe à palettes.

Le rendement massique est bien meilleur que pour l'ultrafiltration-lyophilisation et est proche de 90 %.

Le taux d'incorporation des macromonomères a été vérifié par RMN de l'hydrogène, à titre d'exemple sur les copolymères T10 et T13, dilués à 2 %
10 dans D₂O, à l'aide d'un appareil Bruker à 250 Mhz. Le taux d'incorporation a été évalué par comparaison des intégrales des massifs CH du squelette, CH isopropyl, CH₂ du squelette et CH₃ isopropyl. On trouve respectivement 6,3 % et 13 % en moles, pour T10 et T13, soit respectivement 9,7 % et 19 % en masse, pour des fractions initiales en masse de 12,5% et 25%, respectivement. Ceci
15 montre que le taux d'incorporation du macromonomère est élevé, et que sa proportion dans le copolymère final peuvent être ajustés en faisant varier la fraction initiale dudit macromonomère dans le mélange réactionnel.

La masse moléculaire relative des différents copolymères a également été évaluée par SEC dans une solution aqueuse de LiNO₃ 0,5 M à
20 20°C, en utilisant 4 colonnes Shodex OH Pack B 803 à B806 de 25 cm en série, avec détection réfractométrique, avec un étalonnage de masses moléculaires relatif à des standards POE (masse en équivalent POE). Quelques exemples sont donnés dans le tableau 3

TABLEAU 3

Masse molaire moléculaire (équivalent POE)	T10	T10AA	T11	T12	T16
Mn (10 ³ g/mol)	360	380	100	75	330
Mw (10 ³ g/mol)	1500	950	380	370	1100

EXEMPLE 3 : Evaluation du comportement thermogélifiant de copolymères DMAM-PNAM et AM/PNAM préparés selon l'exemple 2 en fonction de la température.

5 Dans cet exemple, chacun des copolymères a été introduit à raison de 5 % dans l'eau purifiée (MilliQ). La viscosité de chacune des solutions correspondantes a été mesurée sur un rhéomètre cone-plan Brookfield DV3 piloté par le logiciel Rheocalc (Sodexim, Muizon, F). Le taux de cisaillement retenu est de 10 (1/s) pour un gradient de température de 1°C par minute. Les
10 résultats obtenus sont représentés en figure 1.

On peut constater que les différents copolymères synthétisés présentent bien les propriétés rhéologiques qui permettent de les utiliser selon l'invention, et en particulier, qu'ils présentent une viscosité V_2 à une température T_2 significativement supérieure, d'un facteur supérieur à 2 (100 %), souvent
15 d'ordre 10, et pouvant aller jusqu'à un facteur 60, à la viscosité V_1 obtenue à une température T_1 inférieure à T_2 d'au moins 20°.

Pour les polymères décrits dans cet exemple, la température T_1 peut être comprise entre 20 et 40°, ou même inférieure, et la température T_2 peut être supérieure à 45°, et préférentiellement de l'ordre de 60°.

20 On constate également que le polymère T10AA, préparé à titre de témoin selon le même protocole mais sans macromonomère PNIPAM, et ne pouvant donc présenter dans sa structure la multiplicité de blocs à LCST qui caractérise les copolymères selon l'invention, présente une viscosité qui décroît de façon faible et continue en fonction de la température, et ne peut donc
25 exercer les effets bénéfiques de l'invention.

En comparant la figure 1 les tableaux 2 et 3, on note que la viscosité à basse température est fortement corrélée à la masse moléculaire du copolymère.

La figure 2a illustre le comportement rhéologique du copolymère
30 T10 au sein d'un électrolyte ionique tel que par exemple le carbonate de potassium, ou encore un tampon de type TRIS-TAPS 50 mM/Urée 7M tel qu'on en utilise pour le séquençage.

En figure 2b sont représentés les comportements de deux solutions à base du copolymère PAM-NIPAM T10, l'une pour une concentration de 3 % en copolymère et l'autre pour une concentration de 2 % en copolymère. On note que le caractère thermoréticulant est sensible dès 2 %, mais renforcé à 3 % et plus encore à 5 % (figure 1), la concentration étant également un paramètre qu'on fera utilement varier pour adapter les milieux selon l'invention selon les applications particulières.

10 **EXEMPLE 4 : Propriétés de séparation de milieux de séparation pour électrophorèse capillaire comprenant à titre de copolymère, l'un des copolymères préparés selon l'exemple 2.**

Les expériences d'électrophorèse présentées dans cet exemple et les suivants ont été effectuées à l'aide un appareil construit au laboratoire, similaire à celui décrit dans Lindberg et coll., Electrophoresis, 18, 1973 (1997). Les ADN séparés sont détectés par fluorescence avec excitation par un laser Argon à 488 nm et émission à 530+/-30 nm. L'injection est du type électrocinétique. Le capillaire est thermostaté entre le point d'injection et le point de détection par circulation d'huile silicone dans une enveloppe étanche, à l'exception des 2 premiers et des 2 derniers centimètres.

— Dans un premier essai, on teste les propriétés séparatrices d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PAM-NIPAM (T15) à une concentration de 2 % en poids. Celui-ci est mélangé au tampon TRIS-TAPS (50 mM) et au marqueur ADN (pour le SYBR GREEN I 10^{-4}).

Dans ce cas particulier, l'injection est réalisée en 10 secondes à 25 volts par centimètre et l'échantillon à séparer est de même nature que celui de l'essai précédent.

30 Les propriétés séparatrices dudit milieu sont évaluées à deux températures 25°C et 60°C et les figures 3a et 3b rendent compte de ces

propriétés. On constate que la séparation est à la fois plus résolutive et plus rapide à 60°C.

— Dans un second essai, on utilise comme milieu de séparation le
5 copolymère PAM-NIPAM (T12) à une concentration de 8 % en poids mélangé au
tampon TRIS TAPS (50 mM) et au marqueur d'ADN SYBR GREEN I (Molecular
probes) dilué à raison de 10^{-4} . par rapport à la solution stock vendue par le
fournisseur. On note un comportement similaire avec une amélioration de la
résolution et du temps de séparation entre les températures 25 et 60°C .

10 On constate également que la résolution pour de grands fragments
d'ADN duplex est meilleure avec le copolymère T15, préparé avec faible taux
d'agent de transfert et présentant donc une haute masse moléculaire, qu'avec le
copolymère T12 préparé avec un taux d'agent de transfert plus élevé et
présentant une masse moléculaire plus faible.

15

— Dans un troisième essai, on teste les propriétés séparatrices
d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PDMAM-NIPAM
(T7) à une concentration de 2 % en poids. Celui-ci est mélangé au tampon TRIS-
acétate (50 mM) et au marqueur ADN SYBR GREEN I 10^{-4} .

20

Dans ce cas particulier, l'échantillon est le marqueur " Phi-X 174-
RF DNA, Hae III digest " (Pharmacia biotech), dont les fragments ont des tailles
comprises entre 72 et 1358 bp, l'injection est réalisée en 5 secondes à 20 volts
par centimètre et l'échantillon à séparer est de même nature que celui de l'essai
précédent.

25

Les propriétés séparatrices dudit milieu sont évaluées à deux
températures 25°C et 50°C et les figures 4a et 4b rendent compte de ces
propriétés. On constate, comme dans l'essai précédent, que la séparation est à
la fois plus résolutive et plus rapide à plus haute température.

30

- Dans un quatrième essai, on teste les propriétés séparatrices d'un
milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PAM-NIPAM T21,

préparé à partir du macromonomère PNIPAM-20, à une concentration de 2 % en poids. Celui-ci est mélangé au tampon TRIS-acétate (50 mM). Pour ce milieu de séparation, la viscosité à haute température est relativement peu élevée, et ne permet pas une suppression totale de l'électroosmose. En conséquence, le capillaire a été préalablement à sa mise en œuvre, lavé avec une solution d'acide chlorhydrique 1M comprenant 1 % de polyvinylpyrrolidone de masse moléculaire 1 000 000 (Polysciences, Eppelheim, D).

Dans ce cas particulier, l'échantillon est le marqueur "100 bp fluorescein ladder", Bio-Rad, dont les fragments présentent des tailles comprises entre 100 et 1000 bp, l'injection est réalisée en 10 secondes à 25 volts par centimètre.

Les propriétés séparatrices dudit milieu sont évaluées à deux températures 25°C et 50°C et les figures 5a et 5b rendent compte de ces propriétés.

On constate, comme dans l'essai précédent, que la séparation est plus rapide à plus haute température, mais que le gain en résolution est moins important qu'avec par exemple T15 ou T7, qui présentent un caractère thermoréticulant plus marqué. Ceci confirme que le caractère thermoréticulant, tel qu'il apparaît dans les courbes de viscosité en fonction de la température, est un avantage caractéristique des milieux selon l'invention, et que les dites courbes de viscosité peuvent être utilisées comme guide pour l'optimisation des propriétés de séparation.

-Dans un cinquième essai, on utilise pour séparer des produits de séquence un milieu de séparation comprenant le copolymère PAM-NIPAM (T10) à deux concentrations différentes, 3 % et 5 % en poids en tampon TRIS TAPS (50 mM), urée 7M. Le pH du milieu est de l'ordre de 8,2. A titre de témoin, il est réalisé un essai avec un milieu de séquençage commercial (POP6 Perkin-Elmer), utilisé tel que reçu

-Le capillaire utilisé possède une longueur de 40 cm avec une longueur efficace de 30 cm et un diamètre interne de 100 µm. Pour les milieux de séparation à base de polymère T10, qui ne présentent pas de propriétés

spécifiques d'adsorption sur la silice, le capillaire est préalablement à sa mise en œuvre, lavé avec une solution d'acide chlorhydrique 1M et comprenant 1 % de polyvinylpyrrolidone de masse moléculaire 1 000 000

L'échantillon testé est le produit d'une réaction de séquence d'ADN
5 ssM13mp18, (fragments à terminaison " T "), préparé par séquençage cyclique (" cycle sequencing ") avec le kit fluorescein-primer distribué par Amersham, selon les indications fournies par le fabricant.

Le champ électrique est de 200 volts par centimètre et l'injection est réalisée en 8 secondes à 200 volts par centimètre. Les capacités
10 séparatrices de chacun de ces milieux sont évaluées à la température de 60°C. Les figures 6 et 7 rendent compte respectivement des capacités séparatrices du milieu de séquençage commercial (témoin figure a), et des milieux selon l'invention à base du copolymère T10 à des concentrations respectives de 3 % (figures b) et 5 % (figures c) (les numéros au dessus des pics représentent la
15 longueur du fragment d'ADN moins 48 bases)

Les propriétés séparatrices vis à vis de fragments de séquences ont été également vérifiées avec un milieu de séparation à base soit du copolymère PAM-NIPAM (T12) à une concentration de 8 %, du copolymère
20 PAM-NIPAM (T13) avec une concentration de 5 % ou du copolymère DMAM-NIPAM (T7) avec une concentration à 5 %, respectivement.

Chacun de ces milieux est bien entendu complété en tampon TRIS TAPS (50 mM) et en urée 7M. Ils possèdent un pH de 8,2, la nature de l'échantillon et les conditions de séparation sont les mêmes que celles retenues
25 dans le cadre de l'essai précédent.

Ces différents essais confirment que plusieurs milieux selon l'invention, présentant une viscosité à la température ambiante relativement modérée, de l'ordre de 1000 cp ou même nettement inférieure, permettent de séparer des fragments de séquence d'ADN avec des performances égales ou
30 supérieures aux milieux du commerce. On remarquera en particulier que la résolution obtenue avec le T10 à 5% est nettement supérieure à celle obtenue avec le POP6, en un temps légèrement inférieur.

— Dans un autre essai, on teste les propriétés séparatrices d'un milieu comprenant à titre de copolymère le copolymère PAM-NIPAM (T10) à une concentration de 2 % en poids, pour séparer de très grands ADN. Le copolymère est mélangé au tampon TRIS-TAPS (50 mM), EDTA 2 mM et au marqueur ADN SYBR GREEN I 10^{-4} . La longueur du capillaire est de 15 cm, dont 10 cm jusqu'au détecteur, et le capillaire est du type "DB17" (JW scientifique) de diamètre intérieur 100 micromètres, afin de supprimer l'électroosmose résiduelle apparaissant avec ce milieu.

Dans ce cas particulier, l'échantillon est le marqueur High molecular weight standard (Life Technologies), et présente des fragments compris entre 8271 et 48502 paires de bases. l'injection est réalisée en 5 secondes à 100 volts par centimètre. La séparation s'effectue en champs pulsés avec des impulsions carrées de +/- 200V, une asymétrie entre les impulsions + et - de 20 % et une fréquence de 30 Hz. La séparation des fragments peut être effectuée en moins de 20 mn (Figure 8), contre plusieurs heures dans une solution de polymères enchevêtrée ordinaire (Heller et coll. Electrophoresis, 16, 1423-1428 (1995))

EXEMPLE 5 : Préparation de copolymères PVA-NIPAM (PolyVinylAlcool/Poly-N-Isopropylacrylamide)

L'alcool polyvinylique constituant le squelette hydrosoluble du copolymère est obtenu au préalable par hydrolyse de l'acétate de polyvinyle. Le polymère utilisé pour l'étude possède un taux d'acétate de 12,4 % en mole et une masse molaire en poids de 145 000 g/mole. Sa viscosité intrinsèque dans l'eau à 30° C est de 92 ml/g, la concentration critique de recouvrement des chaînes C^* est d'environ 1,25 %.

La voie de synthèse suivie est du type "grafting from". Elle est décrite par Nonaka & al. en milieu homogène (Y. Nonaka, Y. Ogata, S. Kurihara, Journal of Applied Polymer Science, vol. 52, 951-957 (1994)) ou Ikada & al. dans

le cas d'un squelette de polymétacrylate de méthyle (Y. Ikada, Y. Nischizaki, I. Sakwada, J. Polym. Sci., Vol. 12, 1829-1839 (1974)).

La synthèse est réalisée à 60° C pendant 20 heures dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), en présence de persulfate de potassium (KPS) afin de générer des radicaux sur les squelettes PVA. Ces radicaux induisent alors la polymérisation du monomère présent dans le milieu pour conduire au produit final.

La formation de groupements carbonyle selon une réaction secondaire de tautomérie céto-énolique provoque l'apparition d'une coloration jaune effectivement observée durant le synthèse.

Le tableau 4 ci-après rend compte des caractéristiques du PVA-NIPAM obtenus selon ce protocole.

TABEAU 4: produits de réaction et analyse du copolymère PVA-NIPAM produit

	m (g) ou V (ml)
PVA	5g
NIPAM	5g
KPS	0,08g
DMSO	100ml
KPS/PVA ratio molaire	0,26
homoNIPAM m (g) Mw ^b (g/mol)	0,772 19.300
Copolymère m (g) rendement (%)	8,9 89
Taux de greffage ^c % poids NIPAM	32,3

15

^b déterminée par SEC dans le THF à 40°C, avec colonne ustrastyrigel (chromatographe Waters 150 CV+), détection réfractométrique et étalonnage simple par rapport à des standards de polystyrène.

^c déterminée par RMN.

20

EXEMPLE 6 : Préparation d'un copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP

Ce copolymère est préparé selon un protocole dérivé de celui décrit par J.P. Kaczmarek et J.E. Glass, Langmuir, 1994, 10, 3035-3042.

- 5 Environ 10 g de polyéthylèneglycol de poids moléculaire 35.000 (Merck, Hohenbrunn, D) (PEG) et 100 ml de toluène anhydre sont mélangés sous atmosphère d'argon (les polyoxyéthylènes de basse masse moléculaire sont couramment appelés "polyethylene glycol"). Une fois que le PEG est dissous dans le toluène, le mélange est chauffé à reflux sous argon et
- 10 approximativement 10 à 15 ml de toluène anhydre sont évaporés. La solution est refroidie à température ambiante et 120 mg (0,2 % en poids) de dilaurate de dibutylétain sont ajoutés à la solution. Une quantité stoechiométrique de diisocyanate isophorone (128 mg) est dissoute dans 5 ml de toluène anhydre et ajoutée au mélange. La réaction est suivie par visualisation spectroscopie
- 15 infrarouge (par valorisation de la diminution de la bande isocyanate à 2260 cm^{-1}). Au terme de 90 minutes, 2,4 g de polypropylèneglycol monobutyl éther (Mn 400) (PPG) (Aldrich, Milwaukee, USA) sont dissous dans 20 ml de toluène anhydre et ajoutés goutte à goutte au mélange (les polyoxypropylènes de basse masse moléculaire sont couramment appelés "polypropylene glycol").
- 20 La réaction est poursuivie toute une nuit (environ 15 heures) à 5°C (la bande isocyanate décroît à partir du début de la réaction pour se stabiliser ensuite). 80 ml de toluène sont ajoutés au mélange afin de diminuer la viscosité de la solution et le polymère est précipité à l'aide de 550 ml d'éther de pétrole, filtré sur verre fritté n° 4, lavé avec un excès d'éther de pétrole et séché sous vide.

25

EXEMPLE 7 : Détermination du comportement thermoépaississant d'un copolymère PVA-NIPAM et d'un copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP

- 30 Le rhéomètre utilisé dans cet exemple est identique à celui mis en oeuvre dans l'exemple 3 précédent. Le PVA-NIPAM mis en œuvre correspond à celui du tableau 4 et le copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP est celui préparé en exemple 6.

En figure 9 sont représentés les comportements rhéologiques de milieux comprenant

- respectivement 4,5 % en poids de PVA-NIPAM ou 4,75 % en poids de PVA dissous dans un électrolyte 50 mM TRIS-TAPS (figure 9a). On note que le copolymère PVA-NIPAM présente un caractère thermoépaississant à partir d'une température supérieure à 35°C, que ne présente pas le PVA seul.

et

- le caractère thermoréticulant du copolymère tribloc linéaire POP-POE-POP qui épaissit rapidement au delà d'une température de 20°C (figure 9b). Figure également sur ce graphe le comportement rhéologique du polymère polyéthylène glycol à même concentration. Dans ce cas on ne note aucune augmentation de la viscosité en fonction de la température.

EXEMPLE 8 : Propriétés de séparation d'un milieu de séparation électrophorétique comprenant un copolymère PVA-PNIPAM selon l'exemple 5.

La détection par fluorescence se fait dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 4. En ce qui concerne le canal capillaire il a une longueur totale de 40 cm et une longueur efficace de 30 cm, un diamètre interne de 100 µm et il est revêtu d'un dérivé d'acrylamide selon le procédé décrit dans par HJERTEN J. Chromatogr., 1985, 347, 191 afin de supprimer l'électroosmose.

L'électrolyte comprend 4,75 % en poids du copolymère PVA-PNIPAM et 50 mM de tampon TRIS TAPS.

Le champ électrique est de 200 volts par centimètre. L'injection est réalisée en 10 secondes à 200 volts par centimètre. L'échantillon est le sizer 50-500, Pharmacia Biotech, dilué à 1/500 dans de l'eau MILLI Q (Miliport).

Les propriétés séparatrices sont appréciées à deux températures, 20°C (figure 10a) et 44°C (figure 10b). Le temps de séparation est amélioré, mais la résolution n'est pas augmentée de façon notable, ce qui est sans doute dû à la trop faible viscosité atteinte à 44°C pour ce milieu.

EXEMPLE 9: Propriétés séparatrices d'un milieu de séparation comprenant à titre de copolymère un copolymère tribloc POP-POE-POP selon l'exemple

5 **8.**

Le milieu a été testé dans les conditions préconisées pour le milieu décrit en exemple 7 précédemment.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11.

La figure 11a rend compte des propriétés séparatrices du milieu
10 témoin c'est-à-dire à base simplement de polyéthylène glycol non modifié, à 20°C. La figure 11b rend compte des propriétés séparatrices d'un milieu comprenant le copolymère POP-POE-POP à une température de 20°C par analogie au milieu témoin et la figure 11c illustre les propriétés séparatrices d'un milieu à base dudit copolymère mais à une température de 50°C. Ceci montre
15 que le copolymère présente dès la température ambiante une résolution supérieure à celle obtenue avec le POE seul, sans doute à cause de sa masse moléculaire supérieure, mais que les propriétés sont encore grandement améliorées quand on passe à 50°C, et montre que les polymères du type séquencé présentant au moins deux blocs à LCST peuvent également être
20 utilisés avantageusement dans le cadre de l'invention pour effectuer des séparations électrocinétiques.

EXEMPLE 10 : Préparation d'un copolymère chargé PAAgNIPAM (Acide
25 **Polyacrylique/Poly-N-Isopropylacrylamide).**

L'acide polyacrylique utilisé est en solution à 12,5 % dans l'eau. Le polymère noté PAA500 a une masse molaire moyenne en poids de 500 000 g/mol (Fluka)

30 Le squelette du PAA500 est sensible au pH ; les fonctions carboxyliques ionisables ont un pK_0 aux alentours de 4,25 unités pH.

La voie de synthèse suivie consiste à greffer de courtes chaînes de NIPAM sur une fraction faible des fonctions acide carboxylique d'un squelette d'acide polyacrylique. Elle se décompose en deux temps :

- 5 Synthèse d'oligoNIPAM, courte chaîne de PNIPAM ($M_w \approx 2\,000$ g/mol) terminée par une fonction amine, et ce par polymérisation radicalaire de monomères NIPAM dans le méthanol en présence de l'agent de transfert AET,HCl (2-aminoéthanethiol hydrochloré) et de l'initiateur AIBN (2,2'-azobistutyronitril) à 60°C pendant 20 heures. (ce mode de synthèse constitue
10 une alternative à celui, en solution aqueuse, utilisé pour préparer les polymères PNIPAM-A dans l'exemple 1)

On effectue ensuite le greffage des oligoNIPAM de longueur connues sur le squelette PAA500 réaction entre groupes fonctionnels acides et amines en présence d'un amorceur podiimide :

- 15 - soit dans l'eau à 60°C pendant 1 heure (amorceur EDC 1,2 dichloroéthane),
- soit dans la N-Méthylpyrrolidone (NMP) à 60°C pendant 24 heures (amorceur DCCI dicyclocarbodiimide).

Le tableau 5 rend compte de la composition du copolymère
20 PAAgNIPAM obtenu par ce protocole.

Tableau 5:

Synthèse dans l'eau du PAAgNIPAM I		
	m(g) ou V (ml)	n (mmol)
OligoNIPAM	1,7g	0,7
PAA500	3g	
Amorceur	0,575g	3
Solvant	250 ml	
Copolymère m (g)	4,58	
taux de greffage ^a	18	

^a % en poids de NIPAM déterminé par RMN.

EXEMPLE 11 : Comportement rhéologique du copolymère PAAgNIPAM I.

5 L'évolution de la viscosité en fonction de la température a été tracée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 6 ci dessus mis à part l'utilisation d'un gradient de cisaillement de 100 s^{-1} et d'une vitesse de montée en température de 2°C par minute. L'effet thermoépaississant apparaît à 33°C pour le PAAgNIPAM I et se prolonge jusqu'à 65°C , ne présentant sur cette
10 gamme de température qu'une phase de croissance et l'amorce d'un palier. Ceci montre qu'à l'aide des exemples et descriptions données ci-dessus, il est également possible de préparer des copolymères présentant un squelette hydrophile chargé et une multiplicité de blocs à LCST donnant lieu à une thermoréticulation et utilisables dans le cadre de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Milieu thermosensible pour la séparation électrocinétique d'espèces au sein d'un canal de séparation, ledit milieu comprenant un électrolyte dans lequel est dissous au moins un ensemble de copolymère blocs caractérisé en ce que lesdits copolymères blocs :

- sont présents dans ledit électrolyte à une concentration suffisante pour conférer audit milieu la faculté de transiter réversiblement d'un état de viscosité V1, obtenu à une température T1, vers un état de viscosité V2 supérieure d'au moins 100 % à V1, obtenu à une température T2 supérieure d'au moins 20°C à T1 et

- comprennent dans leur structure au moins
- deux blocs polymériques non-contigus présentant dans ledit électrolyte une LCST et possédant un nombre moyen d'atomes le long de leur squelette supérieur à 50 et

- un bloc polymérique soluble dans l'électrolyte aux températures T1 et T2.

2. Milieu selon la revendication 1 caractérisé en ce que la température T1 est comprise entre 15 et 30°C.

3. Milieu selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que la viscosité V2 est supérieure d'au moins un facteur de 5 à la viscosité V1.

4. Milieu selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que tout ou partie des blocs à LCST possèdent le long de leur squelette un nombre moyen d'atomes supérieur à 250.

5. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'ensemble des blocs à LCST représentent entre 2 et 25 % et de préférence entre 5 et 15 % de la masse molaire totale moyenne desdits

copolymères, ou entre 3 et 20 % et de préférence entre 5 et 10% de la composition totale des copolymères en nombre de moles de monomères.

6. Milieu selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce
5 que tout ou partie desdits polymères se présentent sous la forme de polymères à blocs séquencé.

7. Milieu selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce
que tout ou partie desdits polymères se présentent sous la forme de
10 copolymères en peigne dont le squelette est constitué par un ou plusieurs blocs solubles dans ledit électrolyte aux températures T1 et T2.

8. Milieu selon l'une des revendications précédentes
caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possèdent un nombre
15 moyen d'atomes, le long d'une section de bloc soluble comprise entre deux points de liaison consécutifs dudit bloc soluble avec des blocs à LCST, supérieur à 200.

9. Milieu selon l'une des revendications précédentes
20 caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possèdent une masse moléculaire moyenne supérieure à 30 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 2000.

10. Milieu selon l'une des revendications précédentes
25 caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères possèdent une masse moléculaire moyenne comprise entre 50 000 et 2 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 2 500 et 50 000.

11. Milieu selon l'une des revendications précédentes
30 caractérisé en ce que tout ou partie desdits blocs polymériques à LCST possèdent une LCST moyenne comprise entre 20 et 60°C.

12. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie desdits blocs polymériques à LCST dérivent d'un ou plusieurs polymères choisis parmi :

- les polyvinylalkyléther comme le polyvinylméthyléther,
- 5 - les hydroxyalkylcelluloses comme l'hydroxyéthylcellulose et la méthylcellulose,
- les homopolymères d'étheroxydes tels les polyoxyalkylènes comme le polyoxypropylène et le polyoxybutylène,
- les copolymères statistiques et séquencés d'étheroxydes comme
- 10 les copolymères de type polyoxyalkylène présentant une LCST tels les polyoxyéthylène/polyoxypropylène et polyoxyéthylène/polyoxybutylène,
- les homo- et co-polymères alkylènes tels butylène-propylène, éthylène-propylène et éthylène-butylène et
- les dérivés polyacryliques dérivant de l'homopolymérisation ou co
- 15 polymérisation de monomères choisis parmi les acides acrylique et méthacrylique, les acrylates et méthacrylates d'alkyle comme les acrylates d'hydroxypropyle et d'hydroxyéthyle, les N-alkyl-acrylamides ou -méthacrylamides comme les N-éthylacrylamide, N-isopropylacrylamide, les N'N- dialkyl -acrylamides ou -méthacrylamides, les aryl-acrylamides ou
- 20 -méthacrylamides et les alkylaryl-acrylamides ou -méthacrylamides.

13. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le ou les blocs polymériques solubles aux températures T1 et T2 sont constitués d'au moins un polymère choisi parmi les polyéthers,

25 polyesters comme l'acide polyglycolique, les homopolymères et copolymères statistiques solubles du type polyoxyalkylène comme les polyoxypropylène, polyoxybutylène et polyoxyéthylène, les polysaccharides, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone les polyuréthanes, les polyamides, les polysulfonamides, les polysulfoxydes, le polystyrènesulfonate, les polyacrylamides et

30 polyméthacrylamides substitués ou non solubles dans ledit électrolyte.

14. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le copolymère est choisi parmi

- les copolymères du type copolymère en peigne dont le squelette est de type acrylamide, acide acrylique, acryloylaminoéthanol ou diméthylacrylamide et au
5 niveau duquel sont greffées des chaînes latérales de type poly(N-alkyl ou N,N dialkyl)acrylamide, ou des chaînes latérales du type polyoxypropylène ou copolymère polyoxyéthylène/propylène, statistique ou séquencé, ou des chaînes latérales de type polyéther notablement plus hydrophobes que le
10 polyoxyéthylène et
- les copolymères du type copolymère séquencé et présentant le long de leur squelette une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxypropylène, ou une alternance de blocs de type polyoxyéthylène et de blocs de type polyoxybutylène ou une alternance de blocs de polyéthylène et de
15 blocs de type polyéther plus hydrophobes que le polyoxyéthylène.

15. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le copolymère est choisi parmi :

- les polyacrylamide/poly(N-isopropylacrylamide) (PAM-NIPAM) ;
- 20 polyvinylalcool/poly(N-isopropyl- acrylamide) (PVA-NIPAM) ,
- polyoxyéthylène/polyoxypropylène, polyacrylamide/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, polyacrylamide/polyoxypropylène, acide polyacrylique/polyoxypropylène, acide polyacrylique/copolymère oxyéthylène-oxypropylène, acide polyacrylique/poly(N-isopropylacrylamide) et
- 25 polydiméthylacrylamide/ poly(N-isopropyl- acrylamide) (PDMAM-NIPAM).

16. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que tout ou partie des copolymères sont obtenus par :

- copolymérisation de monomères essentiellement du type soluble
30 et de macromonomères essentiellement du type à LCST comportant à l'une au moins de leurs extrémités une fonction réactive, ou

- copolymérisation de macromonomères essentiellement de type à LCST comportant à l'une au moins de leurs extrémités une fonction réactive et de macromonomères essentiellement de type soluble comportant au sein de leur structure au moins deux fonctions réactives.

- 5 17. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il transite d'une viscosité V1 comprise entre 50 et 1000 cp à une température T1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 2 et 50 à une température T2 supérieure à 40 °C et en ce qu'il comprend entre 5 % et 20 % en masse de copolymères possédant
- 10 - une masse moléculaire moyenne comprise entre 30 000 et 200 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal est compris entre 2 000 et 15 000,
- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 3 % et 25 %, et
- 15 - une masse moléculaire moyenne des blocs à LCST comprise entre 2 000 et 20 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST compris entre 50 et 300.

18. Milieu selon l'une des revendications 1 à 9 et 11 à 16
- 20 caractérisé en ce qu'il transite d'une viscosité V1 comprise entre 100 et 5 000 cp à une température T1 comprise entre 15 et 30 °C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 5 et 100 à une température T2 supérieure à 40 °C et en ce qu'il comprend entre 1 % et 8 % en masse de copolymères possédant
- 25 - une masse moléculaire moyenne comprise entre 500 000 et 3 000 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal compris entre 7 000 et 40 000,
- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 3 % et 15 %, et
- 30 - une masse moléculaire moyenne de blocs à LCST comprise entre 3 500 et 30 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST compris entre 50 et 600.

19. Milieu selon l'une des revendications 1 à 9 et 11 à 16 caractérisé en ce qu'il transite d'une viscosité V1 comprise entre 100 et 5 000 cp à une température T1 comprise entre 15 et 30°C vers une viscosité V2 supérieure à V1 d'un facteur compris entre 5 et 1000 à une température T2 supérieure à 40 °C et en ce qu'il comprend entre 0,1 % et 5 % en masse de copolymères possédant

- une masse moléculaire moyenne supérieure à 500 000 ou un nombre d'atomes le long du squelette principal supérieur à 7 000,
- une fraction en masse de blocs à LCST comprise entre 2 % et 15 %, et
- une masse moléculaire moyenne des blocs à LCST supérieure à 5 000 ou un nombre moyen d'atomes le long d'un bloc à LCST supérieur à 150.

20. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que lesdits copolymères sont présents dans ledit milieu à une concentration inférieure à 15 % et de préférence comprise entre 1 et 8 % en poids.

21. Milieu selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte en outre des adjuvants de type particules, polymères hydrosolubles, polymères associatifs non thermoréticulants, ou encore agents de surface, neutres ou ioniques.

22. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications précédentes pour la séparation électrocinétique d'espèces choisies parmi des acides nucléiques, les analogues d'acides nucléiques obtenus par synthèse ou modification chimique, des protéines, des polypeptides, des polysaccharides, des glycopeptides, des molécules organiques, des macromolécules synthétiques ou des particules telles que des particules minérales, de latex, des cellules ou des organelles.

23. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 21 pour le séquençage d'ADN.

24. Utilisation selon la revendication 22 ou 23 caractérisée en ce
5 que pour séparer des molécules de masse moléculaire inférieure à 50 000 ou des oligonucléotides comprenant moins de 100 nucléotides, ou encore des protéines natives ou dénaturées, on utilise un milieu selon la revendication 17.

25. Utilisation selon la revendication 22 ou 23 caractérisée en ce
10 que pour séparer pour séparer des produits de réaction de séquence d'ADN, des ADN duplex de moins de 1000 paires de bases, des protéines dénaturées ou des polymères synthétiques ou naturels de masse moléculaire comprise entre 20 000 et 1 000 000, on utilise un milieu selon la revendication 18.

26. Utilisation selon la revendication 22 ou 23 caractérisée en ce
15 que pour séparer des ADN duplex de taille comprise entre 500 bases et plusieurs millions de paires de bases, ou des particules telles que des latex, des cellules entières, des chromosomes entiers ou des oganelles, on utilise un milieu selon la revendication 19.

20 27 Utilisation selon l'une des revendications 22 à 26 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

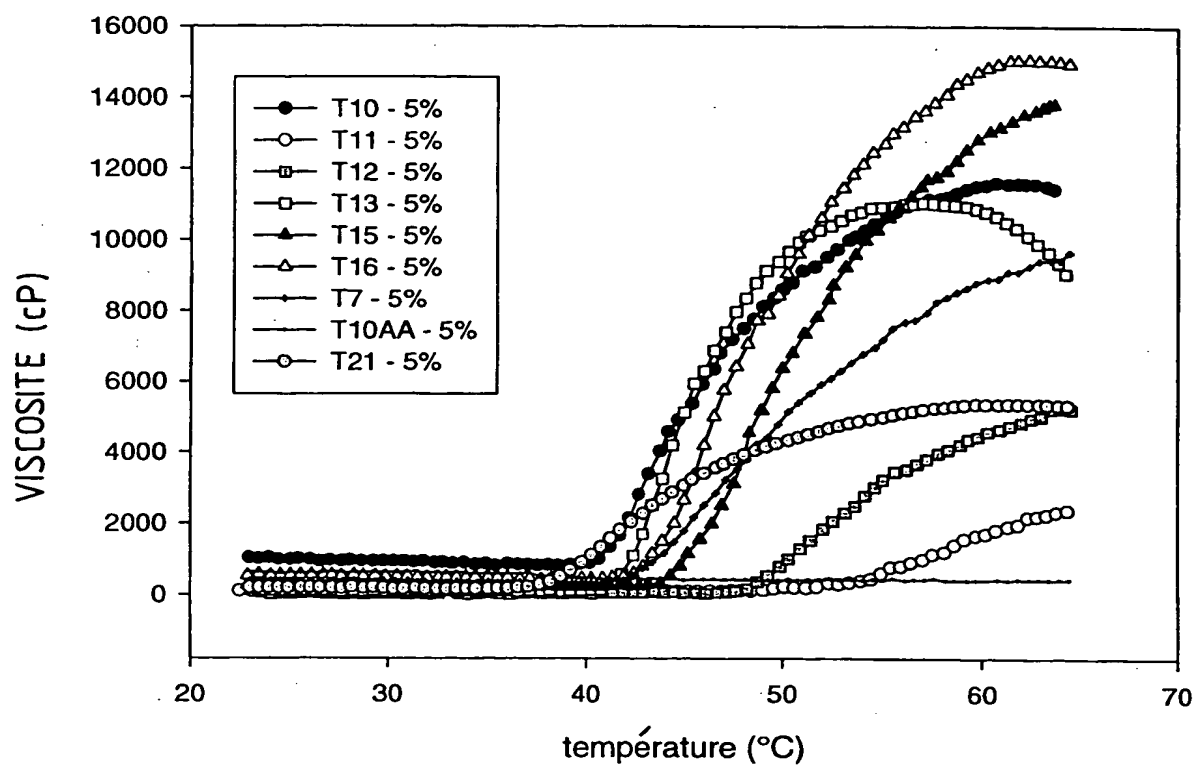
- la sélection d'un milieu de séparation selon l'une des revendications 1 à 22, en fonction des caractéristiques des espèces à séparer ;
- 25 - la mise en oeuvre de ce milieu dans un canal de séparation d'appareil d'électrophorèse en une quantité suffisante pour en constituer le milieu de séparation, ledit canal étant thermostaté à une température voisine de T1;
- le chauffage de la portion thermostatée du canal de séparation
30 à une température voisine de la température T2 ;
- l'introduction à l'entrée du canal de séparation d'une quantité d'échantillon

- la réalisation de la séparation à une température voisine de T2 dans la partie thermostatée du canal; et
- la détection par des moyens appropriés de la migration des analytes.

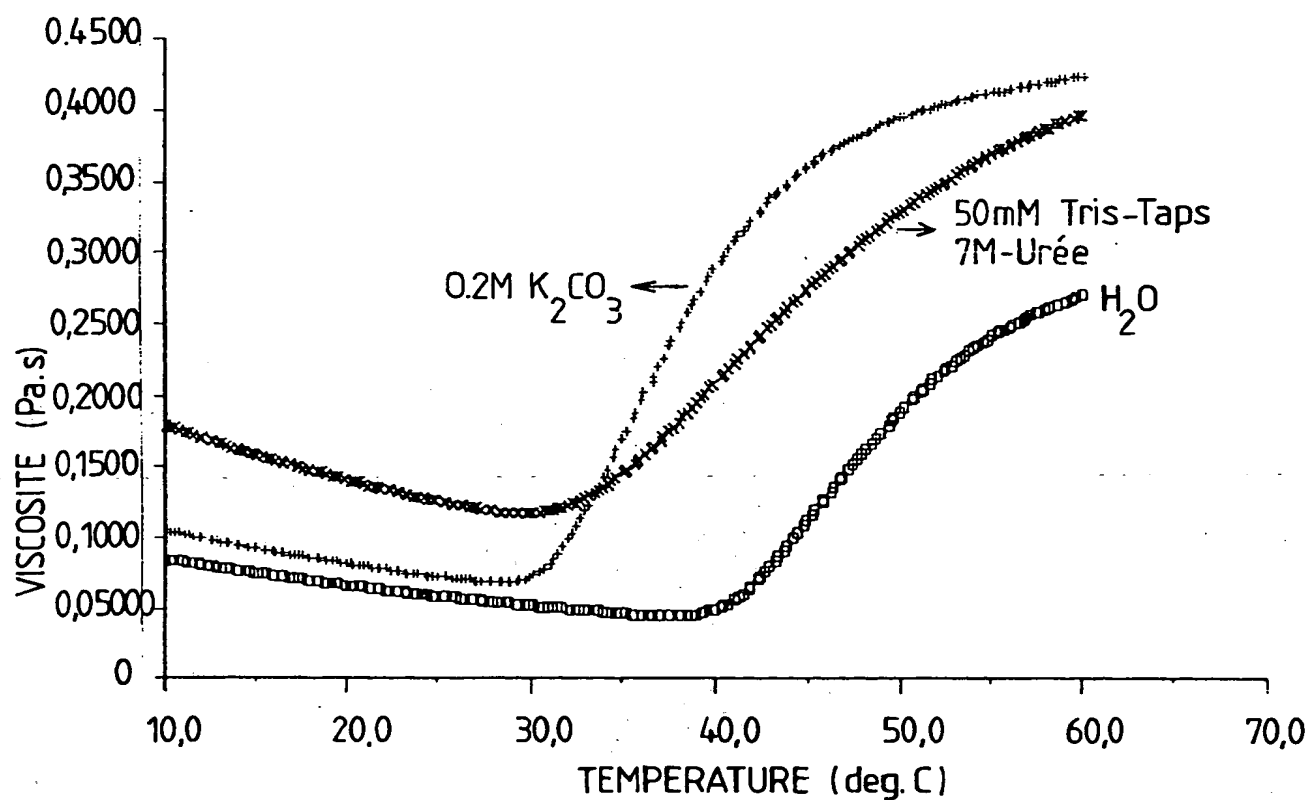
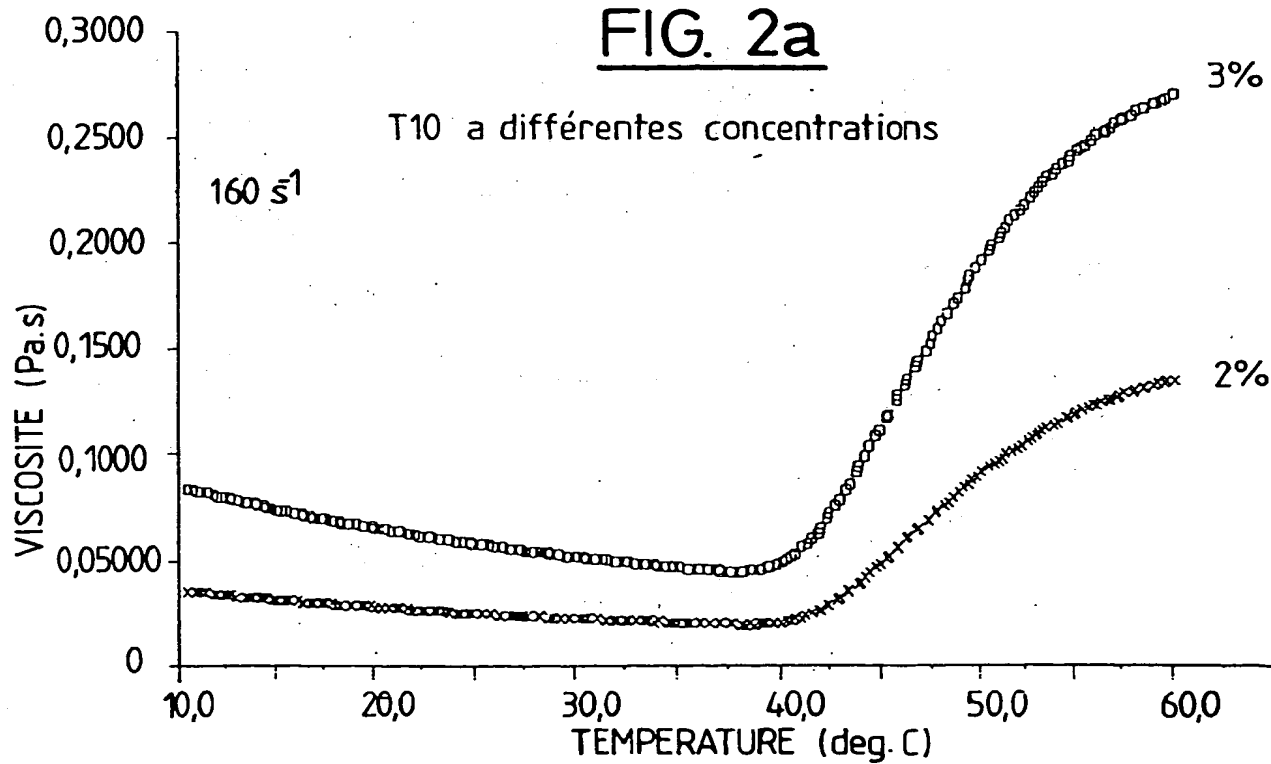
5

28. Dispositif d'électrophorèse capillaire comprenant à titre de milieu de séparation un milieu selon l'une des revendications 1 à 21.

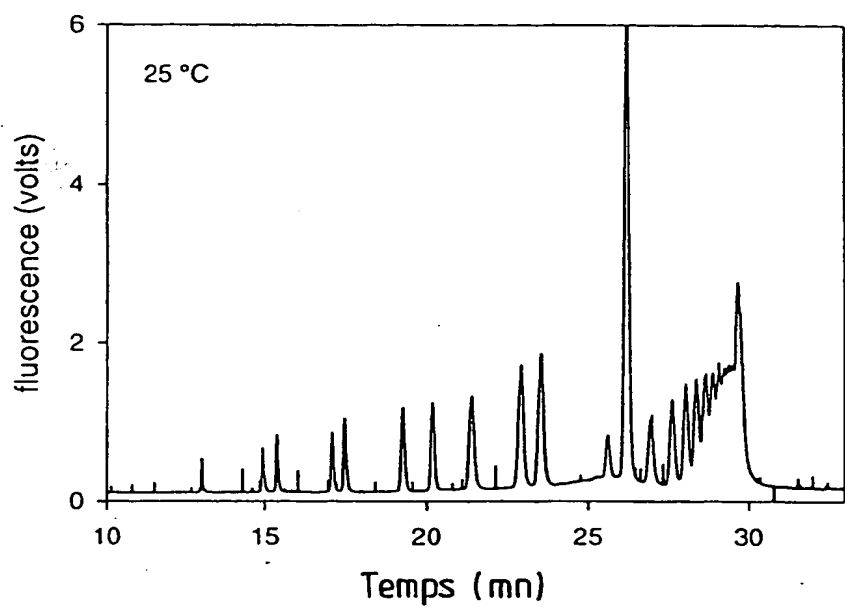
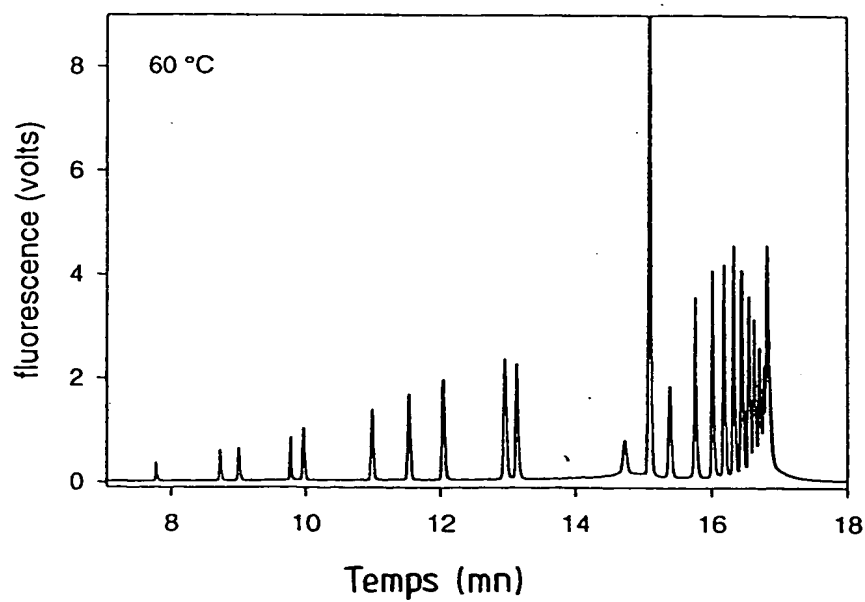
1 / 11

FIG.1

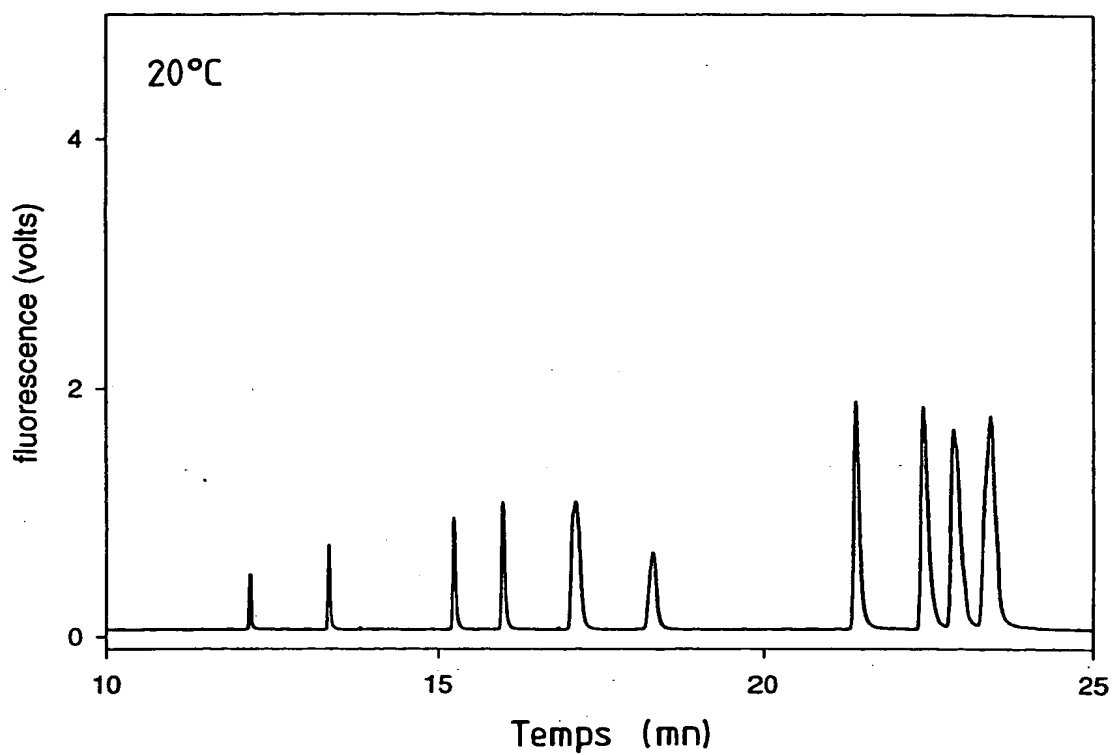
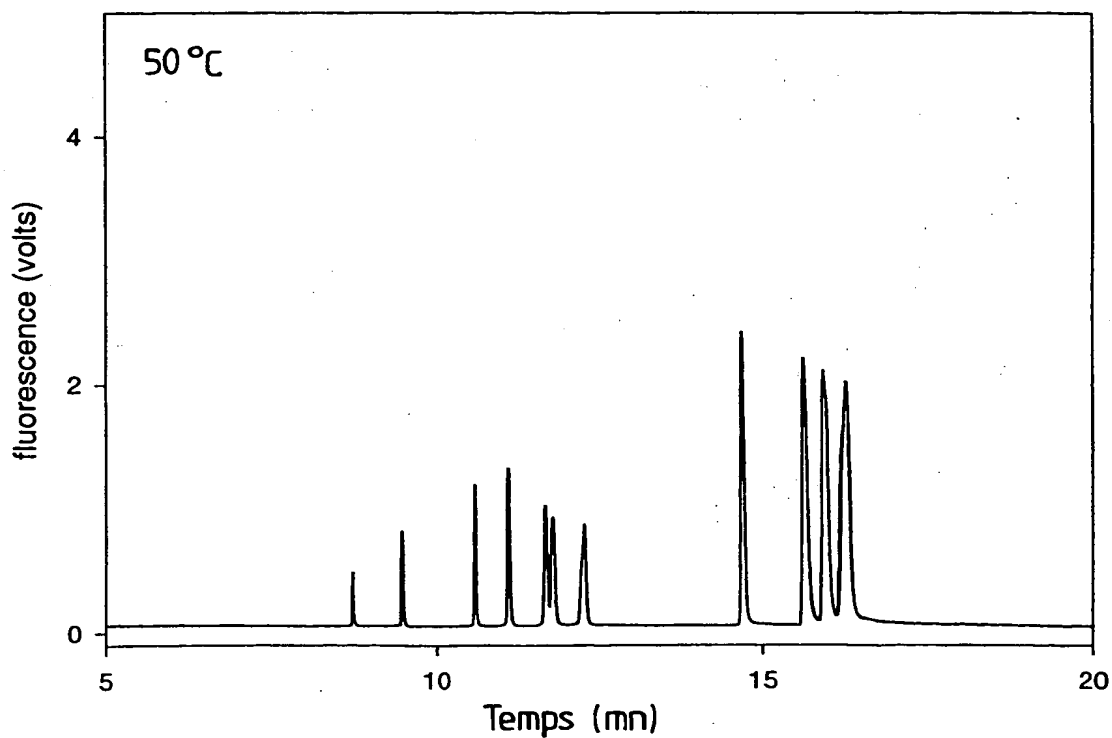
2/11

FIG. 2aFIG. 2b

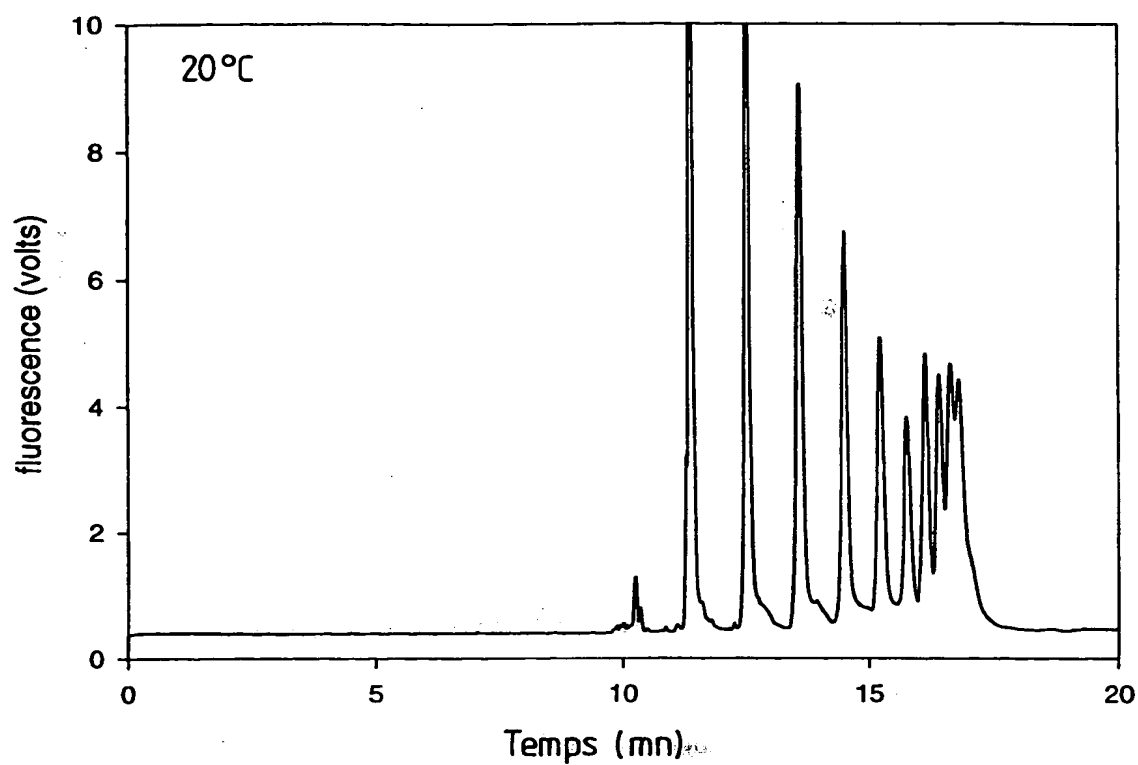
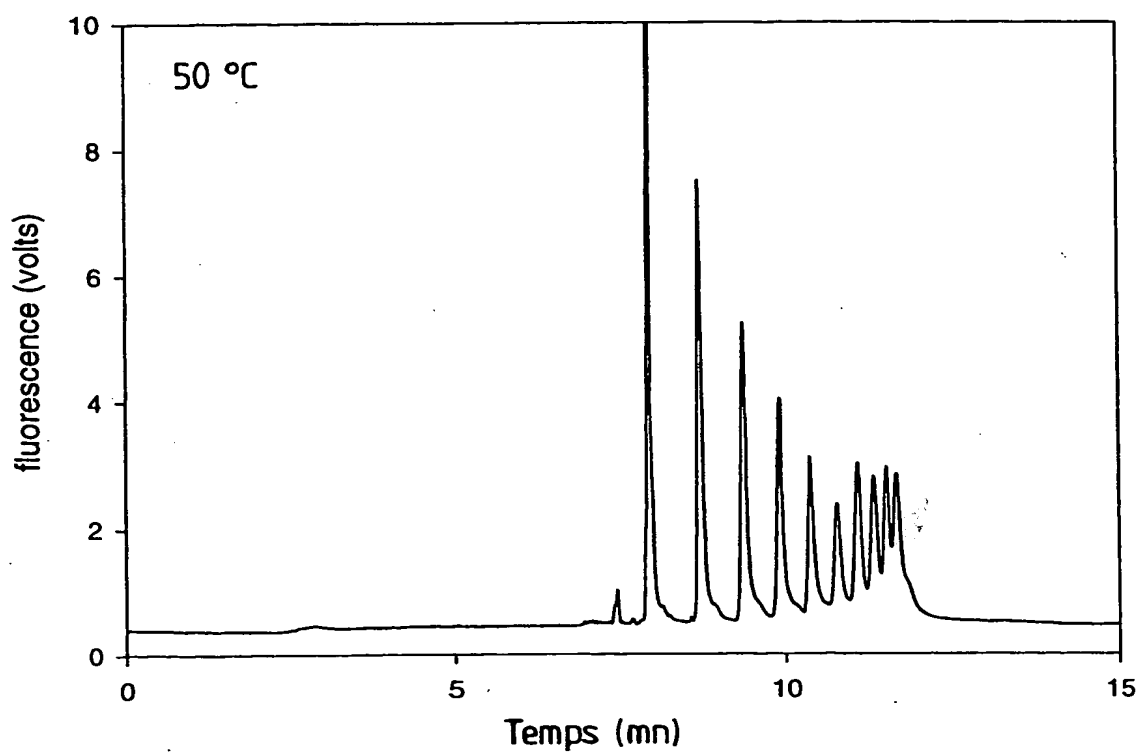
3/11

FIG. 3aFIG. 3b

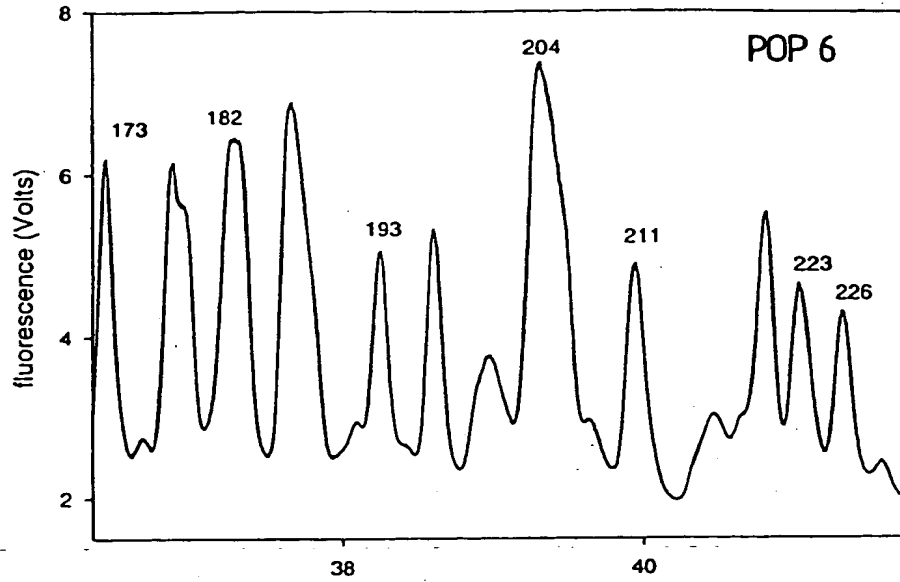
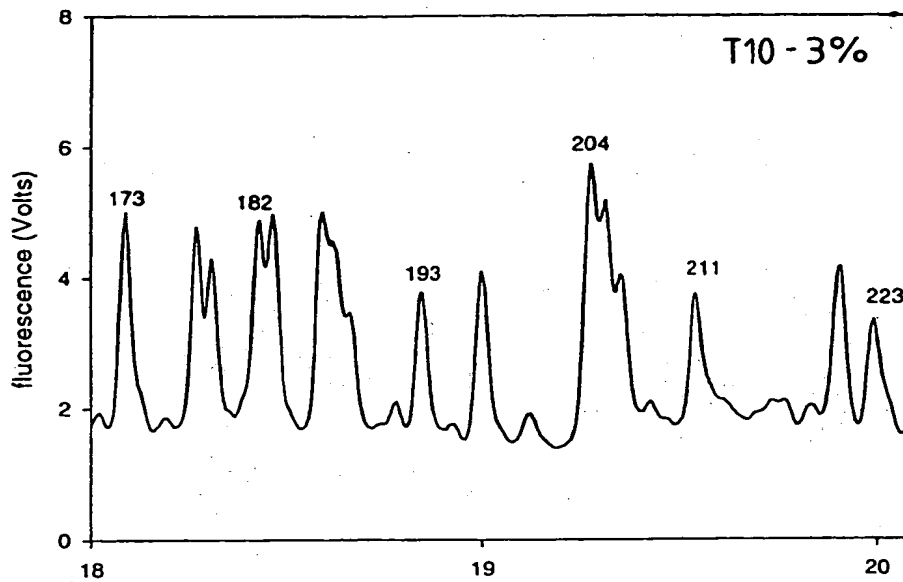
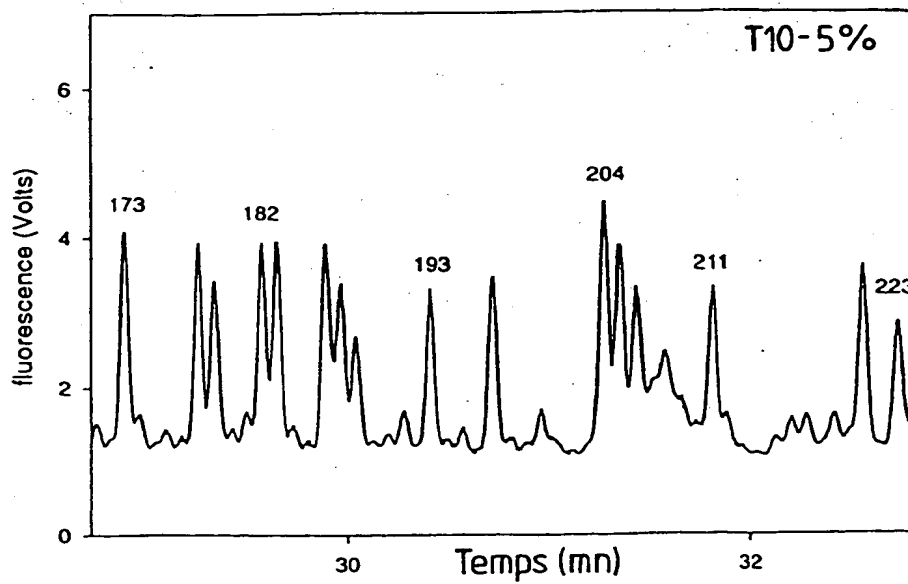
4/11

FIG. 4aFIG. 4b

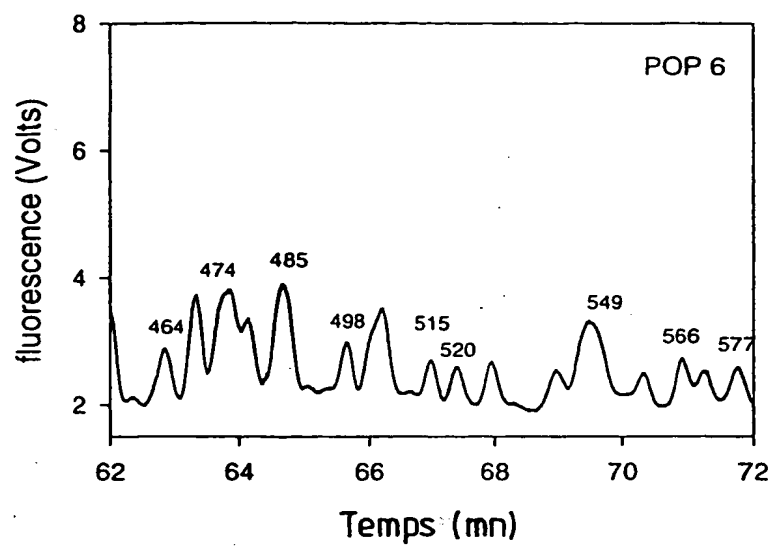
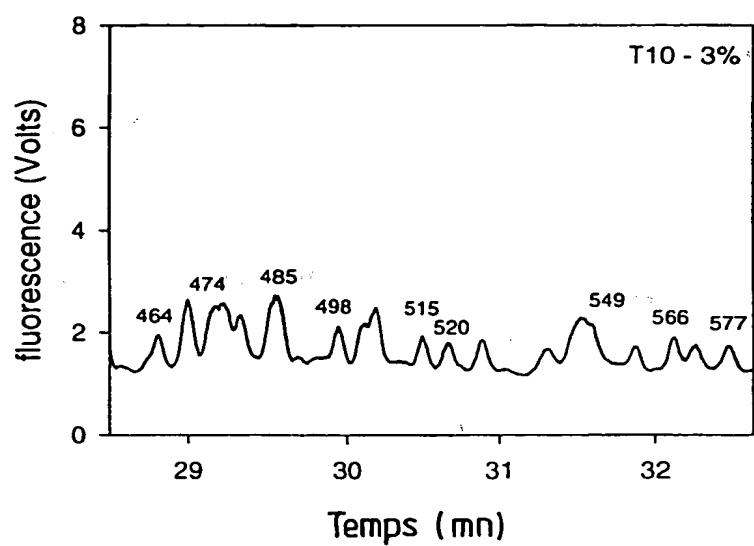
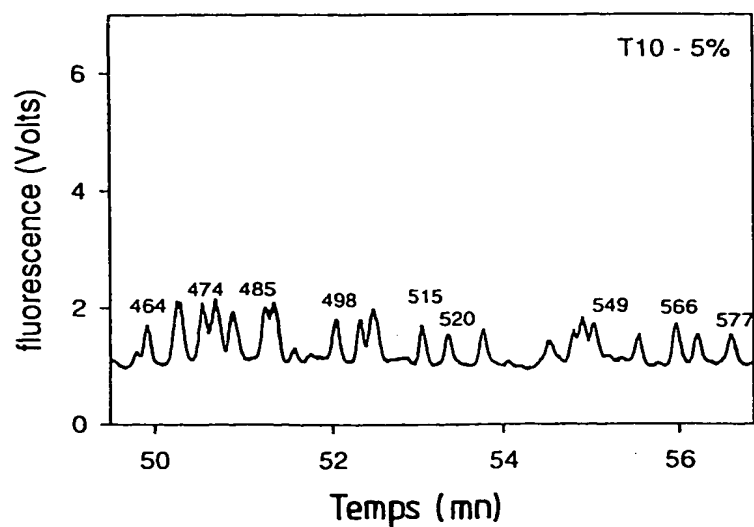
5/11

FIG. 5aFIG. 5b

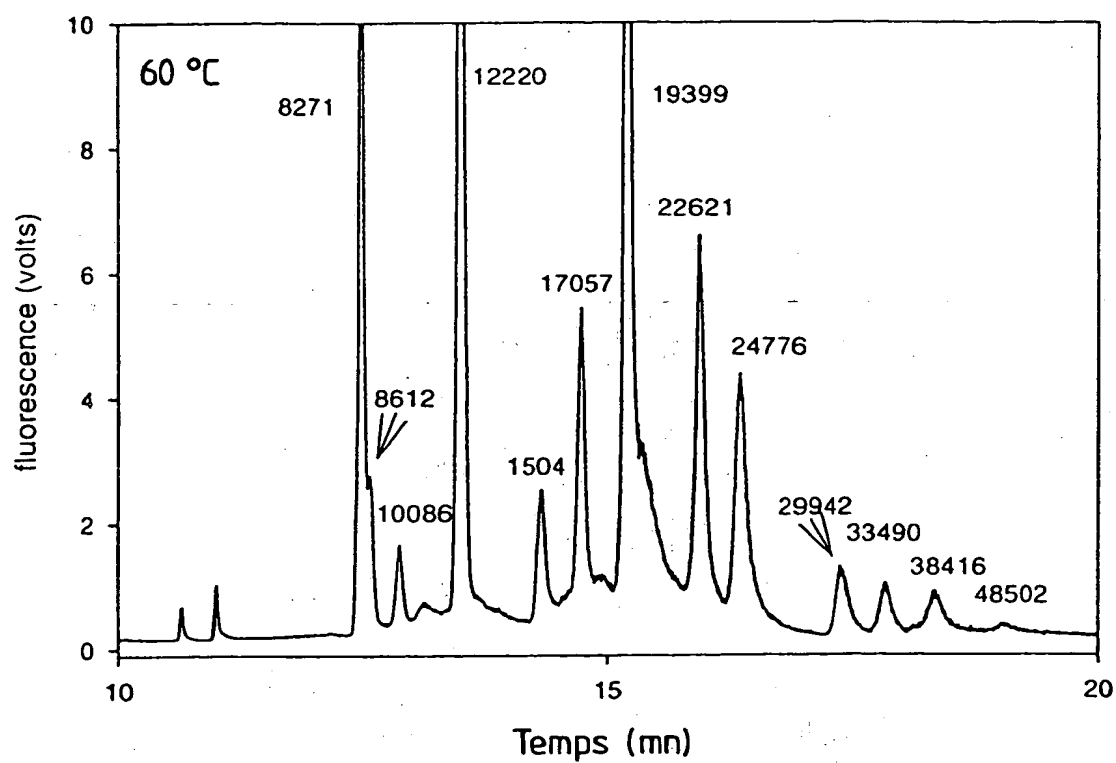
6/11

FIG. 6aFIG. 6bFIG. 6c

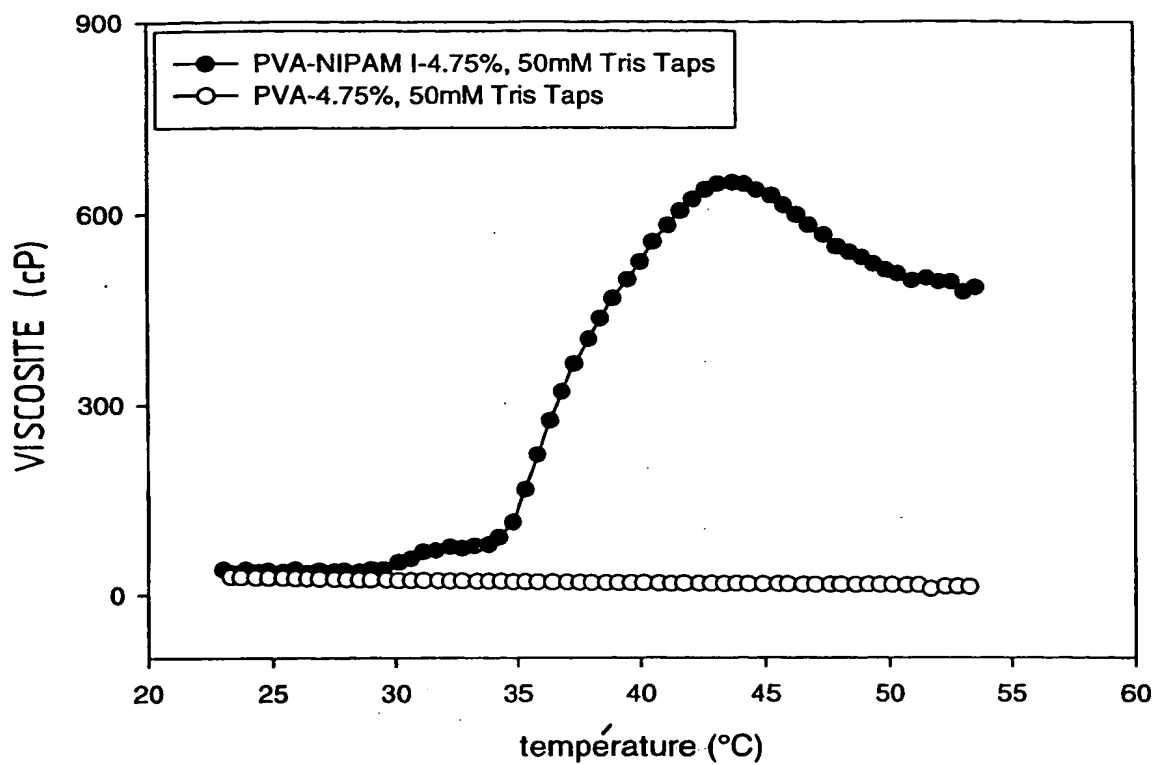
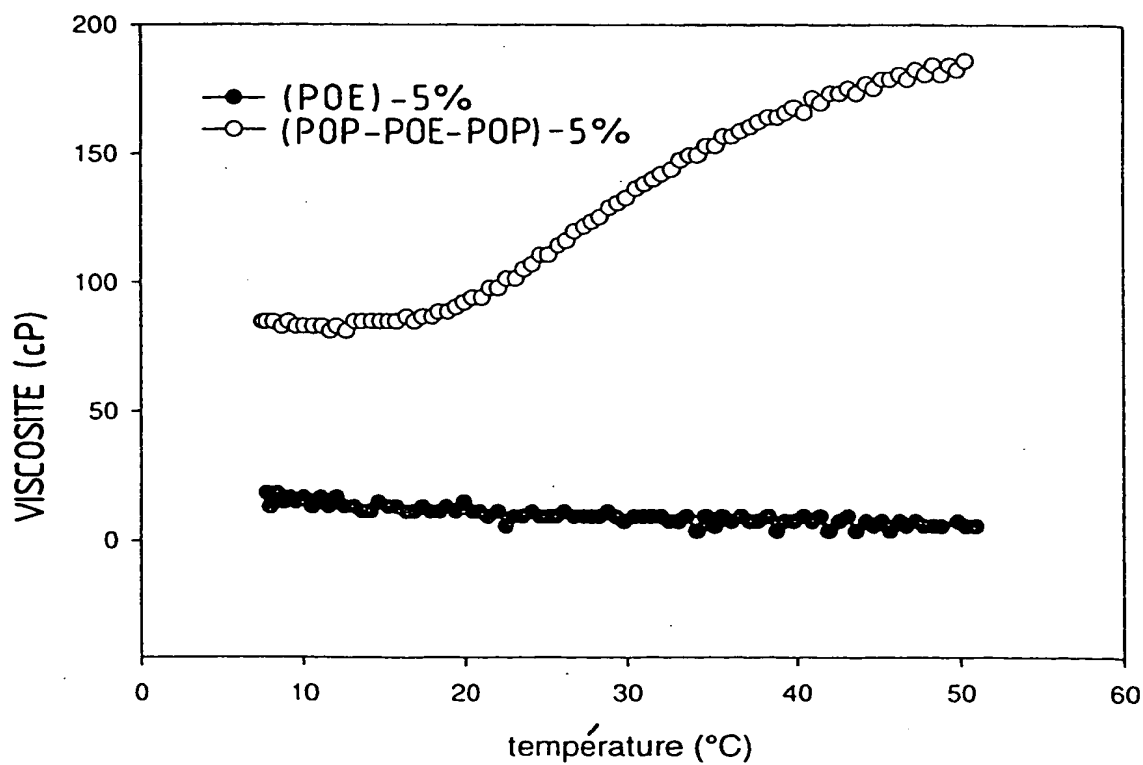
7/11

FIG. 7aFIG. 7bFIG. 7c

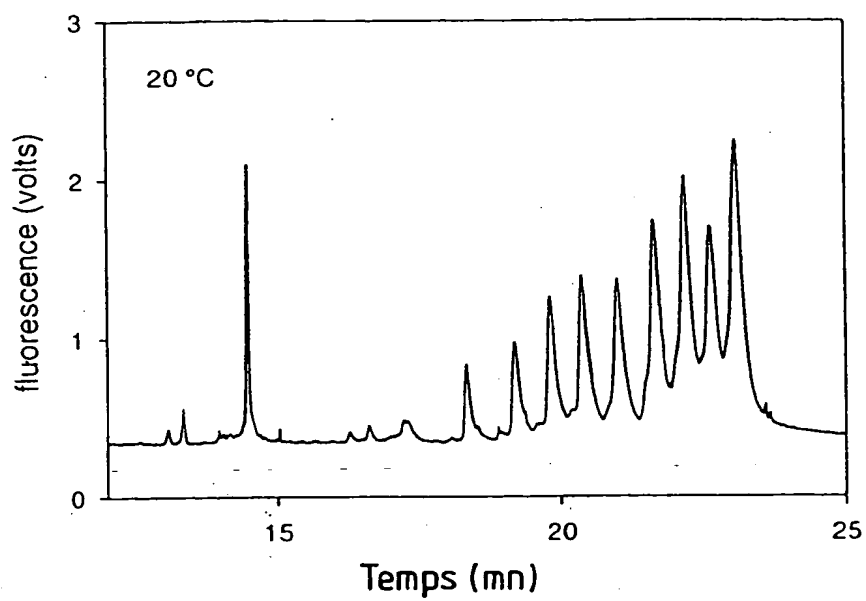
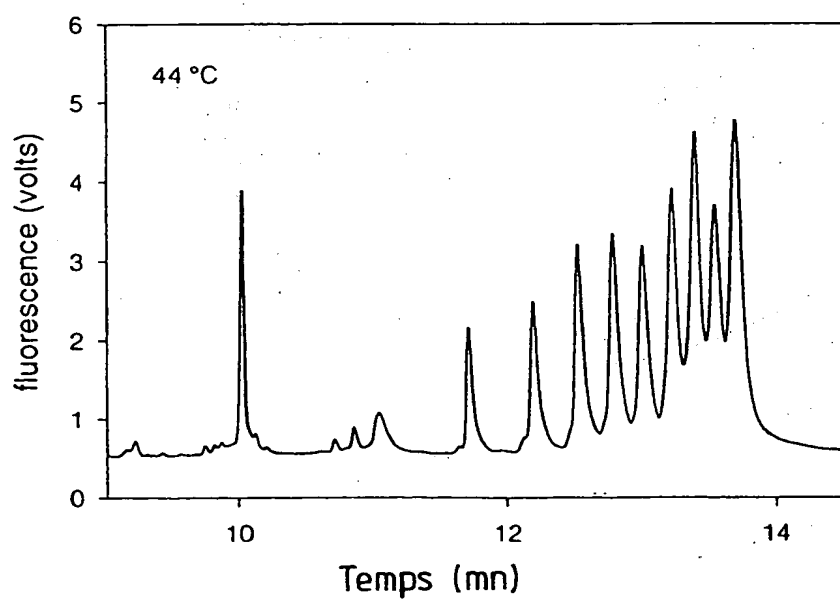
8/11

FIG. 8

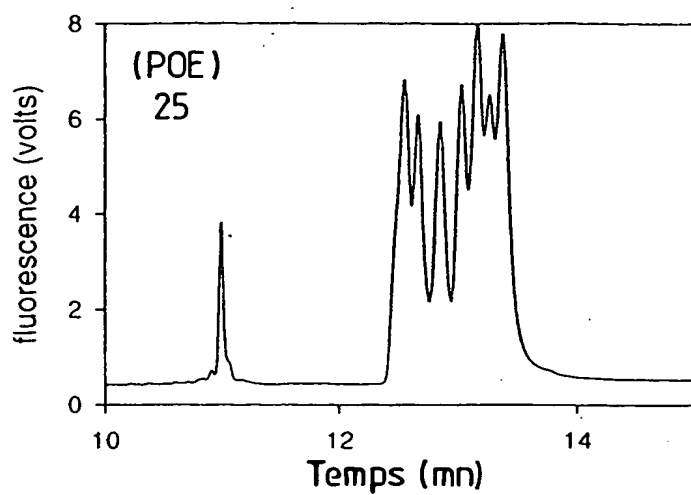
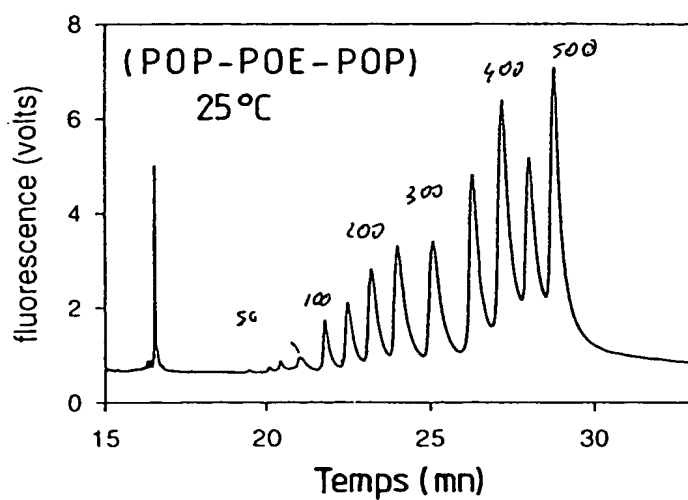
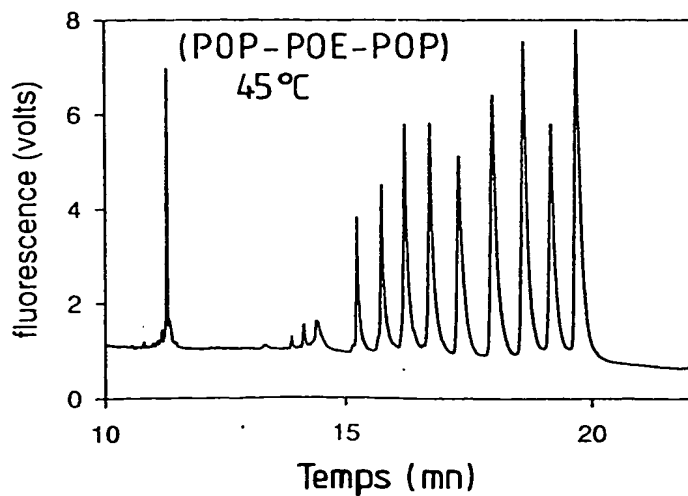
9/11

FIG.9aFIG.9b

10/11

FIG. 10aFIG. 10b

11/11

FIG. 11aFIG. 11bFIG. 11c